

Cristiane Meneghelli

**ATIVIDADE MODULADORA DO EXTRATO
HIDROALCOÓLICO DE PRÓPOLIS CATARINENSE NA
FORMAÇÃO DE VASOS SANGUÍNEOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Doutor em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Orientador: Prof. Paulo Fernando Dias, Dr.

Co-orientador: Prof. Marcelo Maraschin, Dr.

Florianópolis
2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Meneghelli, Cristiane

Atividade moduladora do extrato hidroalcoólico de
própolis catarinense na formação de vasos sanguíneos /
Cristiane Meneghelli ; orientador, Paulo Fernando Dias ;
co-orientador, Marcelo Maraschin. - Florianópolis, SC, 2013.
181 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-
Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Inclui referências

1. Biologia Celular e do Desenvolvimento. 2.
antiangiogênese. 3. própolis. 4. célula endotelial. 5. vias
de sinalização. I. Dias, Paulo Fernando . II. Maraschin,
Marcelo. III. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do
Desenvolvimento. IV. Título.

“Atividade moduladora do extrato hidroalcoólico de própolis catarinense na formação de vasos sanguíneos”

por

Cristiane Meneghelli

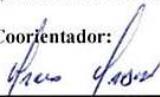
Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (Port. 17/PPGBCD/2013) do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento - UFSC, composta pelos Professores Doutores:

Orientador:



Dr(a). Paulo Fernando Dias (Presidente/Orientador/BEG/CCB/UFSC)

Coorientador:



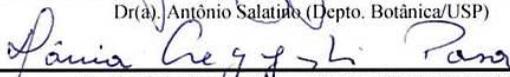
Dr(a). Marcelo Maraschin (FIT/CCA/UFSC)

Banca examinadora:

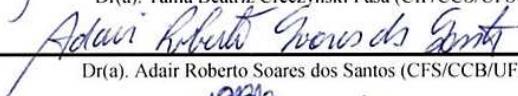


Dr(a). Antônio Ricardo de Toledo Gagliardi (Faculdade de Ciências Médicas de Santos)

Dr(a). Antônio Salatino (Depto. Botânica/USP)



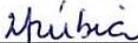
Dr(a). Tânia Beatriz Creczynski Pasa (CIF/CCS/UFSC)



Dr(a). Adair Roberto Soares dos Santos (CFS/CCB/UFSC)

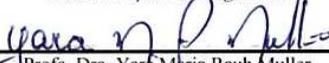


Dr(a). Mabel Mariela Rodriguez Cordeiro (MOR/CCB/UFSC)



Ma. Mara Rubia Romeu Pinto (EPAGRI/Peca)

Coordenação do Programa:



Prof(a). Dra. Yara Maria Rauh Muller
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento

Florianópolis, 11 de outubro de 2013.

Ao mestre Jades Antônio Krause.

(in memoriam)

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos aos professores orientadores Dr. Paulo Fernando Dias (BEG-CCB) e Dr. Marcelo Maraschin (FIT-CCA) pelo voto de confiança e auxílio incondicional em todas as etapas do trabalho, o qual beneficiou o meu desenvolvimento como pesquisadora.

Gostaria de agradecer ainda à Prof^a Dr^a Claudia Maria Oliveira Simões (CIF-CCS) pelo auxílio nas fases iniciais da experimentação *in vitro*; à Prof^a Dr^a Derce de Oliveira Souza Recouvreux (UFSC) pela troca de experiências referentes à cultura celular; à Dr^a Ana Carolina de Mattos Zeri (Laboratório Nacional de Biociências-Campinas/SP) por permitir o uso de equipamentos que possibilitaram a realização da análise por RMN da amostra estudada; à Prof^a Dr^a Ana Lúcia Severo Rodrigues (BQA-CCB) pelo compartilhamento de reagentes que possibilitaram a realização de determinados ensaios; à Prof^a Dr^a Rosa Maria Ribeiro do Valle Nicolau (FMC-CCB) pela atenção dada na avaliação do projeto de tese; à Prof^a MSc Renata Gomes (DLLE-CCE) pela prestimosa correção do abstract.

Aos queridos colegas do laboratório, em especial um agradecimento à Lisiê Silva Dalsasso Joaquim por todo o auxílio de bancada prestado e também pela linda amizade. Quero também agradecer toda a ajuda do Bolsista do Programa PIBIC (2011) Giovanni Loos Queiroz Félix na manipulação com os embriões; da doutoranda Amélia Somensi referente aos dados fitoquímicos e esclarecimentos de dúvidas pertinentes ao assunto; dos graduandos Maíra Tomazzoli e Diego Adílio da Silva pelo preparo dos extratos; à Dr^a Fernanda Vieira

Berti pelo auxílio nos ensaios de tubulogênese; à Dr^a Maria Beatriz Rocha Veleirinho pela assistência nos protocolos do ensaio de proliferação bem como na troca de opiniões; à doutoranda Viviane Aparecida Balvedi Polli pelo auxílio no ensaio de morte celular e pelo grande zelo e dedicação ao laboratório; à doutoranda Nádia Cristina Falcão Búcker por toda a ajuda prestada para a conclusão dos ensaios *in vivo*; ao Dr. Jarbas Mota Siqueira Júnior pela disponibilidade para a discussão de resultados; à Dr^a Mariana Appel Hort pela disponibilidade em todos os momentos; ao doutorando Marcos Raniel Straliozzo pelo auxílio com o ensaio de zimografia.

Um agradecimento especial aos servidores técnicos administrativos Anselmo Soethe Nurnberg, Ronaldo David Barbosa, Gustavo de Farias e Rodrigo Maschio pela presteza no atendimento e simpatia; aos biólogos Chirle Ferreira e Demétrio Gomes Alves pelo auxílio no uso do microscópio de fluorescência; à biomédica Bibiana Sgorla de Almeida pelos esclarecimentos quanto ao citômetro de fluxo. À Coordenação do Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, professoras Dr^a Yara Maria Rauh Müller e a Dr^a Andréa Gonçalves Trentin, pela atenção. À CAPES e FAPESC pelo apoio financeiro.

RESUMO

Inúmeros estudos relacionados à formação de vasos sanguíneos abordam ocorrência de atividade moduladora exercida por produtos naturais no microambiente das células endoteliais. A própolis vem sendo investigada como uma candidata à modulação angiogênica. Entre seus constituintes químicos, encontram-se ácidos fenólicos, ésteres, flavonóides, terpenos, beta-esteróides, aldeídos aromáticos, sesquiterpenos e estilbeno-terpenos, entre outros grupos, sendo que sua composição pode variar de acordo com a fonte botânica do exsudato coletado, bem como das condições ambientais. O extrato hidroalcoólico de própolis coletado no outono/2010 no planalto serrano (município de São Joaquim) teve a sua ação investigada na viabilidade celular, na capacidade de proliferação, na função migratória e na tubulogênese de células endoteliais de veia umbilical humana. Esse extrato apresentou teores elevados de ácidos fenólicos (ácido gálico, ácido protocatecuico, ácido clorogênico e seus ésteres como o ácido isoclorogênico A e ácido isoclorogênico C) e do flavonóide quercetina. O extrato (100 - 200 µg/ml) produziu citotoxicidade e diminuição dos mecanismos de proliferação, migração e tubulogênese. Ele também foi capaz de reverter o efeito proliferativo do fator de crescimento vascular endotelial nas células endoteliais. A atividade da metaloproteinase-9 não foi alterada com 200 µg/ml do extrato. Porém, esta mesma concentração inibiu a atividade proliferativa da proteína quinase C e promoveu um efeito aditivo na inibição do efeito proliferativo da enzima cicloxigenase 1 e 2. Além disso, a administração do composto puro quercetina isoladamente

(40 μM) ou em associação com o extrato (200 $\mu\text{g/ml}$), inibiu a proliferação celular. No ensaio de morte celular, evidenciou-se uma tendência à ação pró-necrótica do extrato. Quando o extrato de própolis foi administrado, *in vivo*, em membranas extra-embrionárias de *Gallus domesticus*, observou-se significativa inibição dos processos de vasculogênese e angiogênese. Os resultados desses ensaios *in vitro* e *in vivo* evidenciam o efeito modulador do extrato hidroalcoólico de própolis outonal catarinense na formação de vasos sanguíneos indicando aplicação em condições patológicas caracterizadas e sustentadas por uma angiogênese excessiva.

Palavras-chaves: Própolis. Flavonóide. Célula endotelial de veia umbilical humana (HUVEC). Tubulogênese. Modulação angiogênica. Terapia antiangiogênica.

ABSTRACT

A number of studies regarding the formation of blood vessels approach the occurrence of modulatory activity exerted by natural products in the microenvironment of endothelial cells. Propolis has been investigated as a candidate for angiogenic modulation. Among the chemical constituents of that complex matrix are phenolic acids, esters, flavonoids, terpenes, beta-steroids, aromatic aldehydes, terpenes, sesquiterpenes, stilbenes and others groups, and its composition may vary according to the botanical source of exudates collected as well as, the environmental conditions. Hydroalcoholic propolis extract collected at autumn/2010 in Santa Catarina State (São Joaquim county) was investigated regarding its action on the cell viability, proliferation and migration, and also on the tubulogenesis of human umbilical vein endothelial cells. This extract has showed a high content of phenolic acids (gallic acid, protocatechuic acid, chlorogenic acid and its ester derivatives isochlorogenic acid A and isochlorogenic acid C) and the flavonoid quercetin. Propolis extract displayed cytotoxic activity (100 - 200 $\mu\text{g/ml}$) and decreased the mechanisms of proliferation, cell migration, and vascular tubulogenesis. The propolis extract was also able in to reverse the proliferative effects of vascular endothelial growth factor on endothelial cells. Activity of metalloproteinase-9 was not influenced by 200 $\mu\text{g/ml}$ extract. However, this treatment inhibited the proliferative activity of protein kinase C and promoted an additive effect in the inhibition of proliferative effect carried by cyclooxygenase 1 and 2. Moreover, the pure compound quercetin when administered alone (40

μM) or in association with the extract inhibited the cell proliferation. Cell death assay showed a tendency a pro-necrotic action by the extract under study. When administered *in vivo* in extra-embryonic membranes of *Gallus domesticus*, the propolis extract promoted a significant inhibition of the vasculogenesis and angiogenesis. Taken together, the *in vitro* and *in vivo* findings evidence the modulatory effects of propolis extract studied on the blood vessels formation, and suggest application in morbidities characterized and sustained by excessive angiogenesis.

Key words: Propolis. Flavonoid. Human umbilical vein endothelial cell (HUVEC). Tube formation. Angiogenesis modulation. Antiangiogenic therapy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Tipos de vasos sanguíneos.....	27
Figura 2 - Camadas que constituem os vasos sanguíneos	28
Figura 3 - Esquema dos tipos de neovascularização	29
Figura 4 - Processos de angiogênese.....	31
Figura 5 - Etapas envolvidas na angiogênese por brotamento	32
Figura 6 - Crescimento intussusceptivo	33
Figura 7 - Diferenciações da células endotelial durante a angiogênese ...	37
Figura 8 - Ativadores e inibidores da angiogênese mais conhecidos	40
Figura 9 - Atuação de fatores angiogênicos na vasculogênese e angiogênese.....	47
Figura 10 - Disposição de um pericito justaposto à célula endotelial	48
Figura 11 - Maturação e regressão do vaso sanguíneo.....	50
Figura 12 - Coleta de exsudato resinoso pela abelha	55
Figura 13 - Vias de sinalização que promovem a angiogênese.....	61
Figura 14 - Estruturas químicas dos componentes da própolis confirmados por RMN	80
Figura 15 - Coloração da própolis outonal coletada no município de São Joaquim/SC	81
Figura 16 - Desenho experimental do ensaio do MTT.....	86
Figura 17 - Placas de cultura após a dissolução do formazan	87
Figura 18 - Desenho experimental da placa de cultura contendo os tratamentos	88
Figura 19 - Confecção de cicatriz sobre a monocamada celular	91
Figura 20 - Esquema do ensaio de tubulogênese.....	93

Figura 21 - Membranas extraembrionárias	99
Figura 22 - Ilustração da posição da MCA no embrião.....	100
Figura 23 - Fotomicrografias do ensaio de proliferação celular (células BrdU+)	110
Figura 24 - Fotomicrografias do ensaio de migração celular	112
Figura 25 - Fotomicrografias do ensaio de tubulogênese.....	113
Figura 26 - Fotomicrografias do ensaio de vasculogênese.....	123
Figura 27 - Fotomicrografias do ensaio de angiogênese	126
Figura 28 - Efeitos da própolis na célula endotelial	133
Figura 29 - Esquema da ação da própolis na sinalização da HUVEC....	137
Figura 30 - Possíveis efeitos da própolis na sinalização da célula endotelial	142
Figura 31 - Resumo esquemático da tese	147

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Efeito de extratos hidroalcoólicos (3) de própolis na viabilidade celular em 24 horas.....	104
Gráfico 2 - Valores de CC ₅₀ em 24 e 72 h.....	105
Gráfico 3 - Efeito de extratos hidroalcoólicos (3) de própolis na viabilidade celular em 72 horas.....	106
Gráfico 4 - Efeito da própolis outonal na proliferação celular	109
Gráfico 5 - Efeito da própolis outonal na migração celular	111
Gráfico 6 - Ação da própolis na tubulogênese	114
Gráfico 7 - Números absolutos de células viáveis.....	118
Gráfico 8 - Ação da própolis outonal na atividade da MMP-9	119
Gráfico 9 - Ação da própolis na sinalização da PKC e COX.....	121
Gráfico 10 - Ação da quercetina na proliferação de HUVEC	122
Gráfico 11- Efeito do extrato hidroalcoólico de própolis na vasculogênese <i>in vivo</i>	124
Gráfico 12 - Efeito do extrato hidroalcoólico de própolis na angiogênese <i>in vitro</i>	125

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentração de flavonóides e ácidos fenólicos totais de extratos de extratos hidroalcoólicos de própolis outonal/2010	75
Tabela 2 - Flavonóides e ácidos fenólicos totais identificados na própolis outonal/2010 pela técnica de CLAE-FR	77
Tabela 3 - Deslocamentos químicos (^1H e ^{13}C -RMN, ppm) e multiplicidade de prótons atribuídos aos compostos fenólicos encontrados na amostra outonal	78
Tabela 4 - Percentuais de compostos fenólicos e flavonóides das amostras de própolis.....	81
Tabela 5 - Número de células viáveis, apoptóticas e necróticas	114

LISTA DE SIGLAS

AINE: anti-inflamatório não-esteroidal

Ang: angiopoietina

APCI: *atmospheric pressure chemical ionization*

APPI: *atmospheric pressure photoionization*

BAEC: *bovine aortic endothelial cell* (célula endotelial de aorta bovina)

BEG : Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética

BrdU: 5-bromo-2'-deoxiuridina

CAPE: *caffeic acid phenethyl ester* (éster feniletil do ácido caféico)

CC₅₀ : Concentração citotóxica da substância em 50% das células na cultura

CLAE-FR: cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa

COX: cicloxigenase

eNOS: *endothelial nitric oxide synthase* (óxido nítrico sintase endotelial)

Epagri: Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina

EPM: erro padrão da média

ERK: *extracellular signal-regulated kinase* (quinase regulada por sinal extracelular)

FAASC: Federação dos Apicultores e Meliponicultores de Santa Catarina

FAK: *focal adhesion kinase* (quinase de adesão focal)

FAPESC: Fundação de Apoio à Pesquisa Científica e Tecnológica do Estado de Santa Catarina

FGF: *fibroblast growth factor* (fator de crescimento de fibroblasto)

FPV: fator de permeabilidade vascular

GAG: glicosaminoglicana

HDMEC: *human dermal microvascular endothelial cell* (célula endotelial da microvasculatura da derme humana)

HeLa: células epiteliais de carcinoma humano

HH: Hamburger e Hamilton

HIF-1: *hypoxia inducible factor-1* (fator de indução de hipóxia)

HUVEC: *human umbilical vein endothelial cell* (célula endotelial da veia umbilical humana)

IP: iodeto de propídio

IP3: inositol 3,4,5 trifosfato

LAMEB: Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia

LEBIMA: Laboratório de Estudos em Bioatividade e Morfogênese Animal

LMBV: Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal

MAPK: *mitogen-activated protein kinase* (proteína quinase ativada por mitógeno)

MCA: membrana corioalantóica

MEC: matriz extracelular

MMP: *matrix metalloproteinases* (metaloproteinases de matriz extracelular)

MTT: *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*
[Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5,-difeniltetrazólio]

MVA: membrana vitelínica

NBR: Norma Brasileira Regulamentatória

NO: *nitric oxide* (óxido nítrico)

NOS: *nitric oxide synthase* (óxido nítrico sintase)

PBS: *phosphate buffer solution* (solução tamponada fosfatada)

PC-PLC: *phosphatidylcholine-specific phospholipase C* (fosfolipase C específica para fosfatidilcolina)

PDGF: *platelet-derived growth factor* (fator de crescimento derivado de plaqueta)

PI3K: *phosphatidylinositol 3-kinase* (fosfatidilinositol-3-quinase)

PIP2: *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate* (fosfatidilinositol-4,5-bifosfato)

PKC: *protein kinase C* (proteína quinase C)

PLC: *phospholipase C* (fosfolipase C)

PlGF: *placental growth factor* (fator de crescimento placentário)

RMN: ressonância magnética nuclear

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

SFB: soro fetal bovino

TGF- β : *transforming growth factor- β* (fator de crescimento transformante- β)

TNF: *tumoral necrosis factor* (fator de necrose tumoral)

UFSC: Universidade Federal de Santa Catarina

VEGF: *vascular endothelial growth factor* (fator de crescimento vascular endotelial)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 HISTÓRICO DO PROJETO DE TESE	20
1.2 CONTEXTUALIZAÇÃO	21
1.3 JUSTIFICATIVA	23
1.4 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	26
1.4.1 Formação de vasos sanguíneos.....	26
1.4.2 Fatores inibidores e estimuladores da angiogênese	40
1.4.3 Mecanismos de sinalização da angiogênese.....	51
1.4.4 Própolis.....	59
1.4.5 Modelos de estudo da angiogênese.....	68
1.4.6 Hipóteses do trabalho.....	71
1.4.6.1 Primeira hipótese	71
1.4.6.2 Segunda hipótese	71
2 OBJETIVOS	72
2.1 OBJETIVO GERAL	72
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	72
3 METODOLOGIA	74
3.1 MATERIAIS	74
3.1.1 Obtenção do extrato de própolis	74
3.1.2 Características organolépticas e químicas do extrato	75
3.1.3 Reagentes	83
3.1.4 Células	83
3.1.5 Embriões	84
3.2 MÉTODOS	85

3.2.1 Ensaio de Viabilidade Celular	85
3.2.2 Ensaio de Proliferação Celular	87
3.2.3 Ensaio de Migração Celular	90
3.2.4 Ensaio de Tubulogênese	92
3.2.5 Ensaio de Morte Celular	93
3.2.6 Ensaio de Zimografia	95
3.2.7 Ensaio de Vasculogênese <i>in vivo</i>	97
3.2.8 Ensaio de Angiogênese <i>in vivo</i>	99
3.2.9 Análise Estatística	102
4 RESULTADOS	103
4.1 EFEITO DE AMOSTRAS SAZONAIS DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA PRÓPOLIS NA VIABILIDADE DE HUVEC.....	103
4.2 EFEITO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA PRÓPOLIS OUTONAL NA PROLIFERAÇÃO DE HUVEC.....	107
4.3 EFEITO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA PRÓPOLIS OUTONAL NA MIGRAÇÃO DE HUVEC	111
4.4 EFEITO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA PRÓPOLIS OUTONAL NA TUBULOGÊNESE DA HUVEC.....	112
4.5 EFEITO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA PRÓPOLIS OUTONAL NO ENSAIO DE MORTE CELULAR.....	114
4.6 EFEITO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA PRÓPOLIS NA ATIVIDADE DE MMP-9	118
4.7 EFEITO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA PRÓPOLIS OUTONAL NA ATIVIDADE DA PKC E COX.....	119

4.8 EFEITO DO FLAVONOIDE QUERCETINA NA PROLIFERAÇÃO DE HUVEC.....	121
4.9 EFEITO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA PRÓPOLIS OUTONAL NA VASCULOGÊNESE <i>IN VIVO</i>	123
4.10 EFEITO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA PRÓPOLIS OUTONAL NA ANGIOGÊNESE <i>IN VIVO</i>	124
5 DISCUSSÃO	127
6 CONCLUSÕES	153
7 PERSPECTIVAS	156
REFERÊNCIAS	157

1 INTRODUÇÃO

1.1 HISTÓRICO DO PROJETO DE TESE

Produtos naturais constituem a fonte de investigação de diversos laboratórios de pesquisa científica pré-clínica da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), entre eles o Laboratório de Estudos em Bioatividade e Morfogênese Animal (LEBIMA, Depto. de Biologia Celular, Embriologia e Genética/CCB), com abordagens sobre a formação de vasos sanguíneos e o Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal (LMBV, Depto. de Fitotecnia/CCA), com ênfase em caracterização bioquímica de plantas. No ano de 2009, a proposta de um projeto de pesquisa intitulado “Tipificação e Efeitos Biológicos da Própolis Catarinense” foi submetida à Fundação de Apoio à Pesquisa Científica e Tecnológica do Estado de Santa Catarina (FAPESC) obtendo o apoio financeiro para a sua execução. O objetivo principal da proposta consistia no desenvolvimento de um banco de dados voltado à tipificação da própolis catarinense por meio do conhecimento da sua composição química e respectivas atividades biológicas. Esse tipo de investigação tornou possível a caracterização desse produto apícola catarinense, de forma que o seu estudo sazonal e regional pode identificar a qualidade da própolis produzida no Estado. Para isso, amostras provenientes de distintas regiões geográficas de Santa Catarina foram coletadas ao longo das estações do ano de 2010 e analisadas, inicialmente, através de metodologias cromatográficas e espectroscópicas. Subsequentemente, investigações relacionadas ao

efeito biológico dessas amostras nas mais variadas abordagens, foram conduzidas. Desta forma, surgiu a motivação para a realização desta tese. Assim, após as análises do perfil químico das amostras, realizado pela equipe de pesquisadores do LMBV (Núcleo de Produtos Naturais), a amostra de própolis com níveis mais pronunciados de flavonóides e ácidos fenólicos totais foi selecionada, dentro de cada grupo sazonal de amostras, para os ensaios que envolviam formação de vasos sanguíneos a serem conduzidos no LEBIMA, produto desta tese.

1.2 CONTEXTUALIZAÇÃO

Um dos produtos naturais utilizados durante séculos pela humanidade tem sido a própolis, um composto resinoso coletado e sintetizado pelas abelhas, a qual é administrada sob diversas formas (PEREIRA et al., 2002). A própolis é uma das poucas substâncias naturais a permanecer popular ao longo dos anos e seu uso data de 300 a.C. (MARCUCCI, 1995; BANKOVA et al., 2000; CASTALDO; CAPASSO, 2002; DA SILVA et al., 2006). O uso da própolis pelos humanos tem uma longa história. Os egípcios conheciam as atividades anti-putrefativas da própolis e a empregavam para embalsamar suas múmias (LUSTOSA et al., 2008). Além disso, foi reconhecida por suas propriedades medicinais por médicos da antiguidade como Aristóteles, Dioscorides, Plínio e Galeno (CASTALDO; CAPASSO, 2002). Contudo, atualmente, devido às suas características de panacéia, os profissionais da saúde tendem a desconfiar da sua eficácia devido a

serem atribuídas dezenas de atividades biológicas, simultaneamente (PEREIRA et al., 2002).

Nas últimas décadas, as publicações na literatura científica a respeito da composição química da própolis e respectivas propriedades biológicas vêm aumentando, revelando o seu potencial para o desenvolvimento de novos fármacos (SFORCIN; BANKOVA, 2011). Essa substância resinosa coletada da flora local e elaborada pelas abelhas, bem como os compostos presentes evidenciam diversas atividades biológicas, entre elas pode-se citar as ações imunomoduladora, antibacteriana, antifúngica, antiviral, antioxidante, antitumoral e antiinflamatória (MENEZES, 2005; LOFTY, 2006; SFORCIN, 2007; TEIXEIRA et al., 2008). De especial interesse à presente investigação destacam-se os efeitos antiangiogênicos demonstrados por amostras de própolis provenientes do Brasil e de territórios estrangeiros (HEPSEN et al., 1999; SONG et al., 2002; AHN et al., 2007; OHTA et al., 2008; MOTOMURA et al., 2008; KESHAVARZ et al., 2009; KUNIMASA et al., 2009; MESSERLI et al., 2009; MOURA et al., 2009; BASINI et al., 2010; CHIKARAISHI et al., 2010; DALEPRANE et al., 2012).

A angiogênese é considerada um alvo terapêutico importante em diversas doenças nas quais evidencia-se um concomitante crescimento irregular de vasos sanguíneos contribuindo para um contexto inflamatório crônico no qual, dentre outras características, observa-se uma exacerbada proliferação. As alterações vasculares podem afetar diversos órgãos ou tecidos do corpo humano, sendo cruciais no câncer, na retinopatia diabética, na psoríase, na artrite reumatóide, na

endometriose e na obesidade, entre outros (FERRARA; KERBEL, 2005; FOLKMAN, 2007; OTROCK et al., 2007). Folkman (1974), foi o primeiro a considerar que o desenvolvimento de abordagens terapêuticas deveria concentrar-se diretamente nas respostas das células endoteliais aos diferentes agentes ou princípios ativos.

Em uma revisão de 2012, Sawicka et al., destacam que a própolis possui efeitos antitumorais por ser capaz de diminuir a proliferação celular através da indução de apoptose. Efeito semelhante foi demonstrando no ano de 2009 por Kunimasa et al., em células endoteliais e, em 2008, por Motomura et al., em células leucêmicas humanas.

Em virtude disso, a investigação da própolis produzida no Estado de Santa Catarina, com o objetivo de caracterizar experimentalmente efeitos antiangiogênicos em modelos *in vivo* e *in vitro*, torna-se oportuna e necessária, uma vez que dados referentes a ações biológicas da própolis catarinense são escassos na literatura.

1.3 JUSTIFICATIVA

Embora pesquisadores já tenham relatado as atividades biológicas de própolis coletadas em várias partes do mundo, dados sobre a própolis catarinense são poucos, uma vez que é mínimo o que se conhece a respeito de suas características químicas, de forma a caracterizá-la como um produto potencial. O fato de que o conhecimento mais aprofundado a respeito das ações dessa própolis possa promover o embasamento à sua caracterização como produto apícola de uso no desenvolvimento de

produtos farmacêuticos, torna-se uma virtuosa perspectiva. Tal assertiva baseia-se em contexto etnofarmacológico, por explorar cientificamente os agentes biológicos ativos, tradicionalmente empregados ou observados pelo homem (ELISABETSKY; SOUZA, 2010), podendo constituir um valioso atalho à descoberta de fármacos. Para tanto, os resultados da pesquisa científica básica proveniente da presente tese acrescentam novos dados que, em conjunto com os resultados referentes ao perfil químico, incrementam a qualidade da própolis catarinense, além de seu valor de mercado, tornando-a uma matéria-prima mais atrativa ao desenvolvimento de produtos de interesse à saúde humana e animal.

Além do propósito de gerar conhecimento técnico-científico que venha a impactar positivamente os setores produtivos da própolis catarinense e seus derivados, torna-se desejável o enquadramento como fármaco de modo a substituir o conceito de pretenso remédio universal para todos os males físicos. Portanto, o presente estudo visa contribuir cientificamente para as potenciais aplicações da própolis catarinense.

Ressalta-se ainda, que há uma década, a própolis brasileira já era considerada de alto valor não somente pelas propriedades farmacológicas atrativas, mas pelo menor teor de metais pesados e demais poluentes ambientais. De fato, dados da Federação de Apicultores de Minas Gerais revelam que a própolis produzida naquele Estado foi considerada a melhor do mundo no mercado japonês (PEREIRA et al., 2002). Sendo assim, é imprescindível caracterizar a própolis catarinense para gerar subsídios capazes de inseri-la nesse mercado.

A diminuta quantidade de dados referentes ao conteúdo químico bem como ações farmacológicas constituem um expressivo objeto de estudo importante da própolis catarinense. Uma vez que o controle das respostas de células endoteliais constituem um alvo crucial para a terapia de inúmeros distúrbios e, também, que amostras de própolis oriundas de outras regiões evidenciaram modulações angiogênicas, encontrou-se a motivação para buscar um maior conhecimento sobre a própolis do Estado de Santa Catarina quanto às ações sobre as células formadoras de vasos sanguíneos. É importante destacar que os Estados Unidos da América têm investido mais de quatro bilhões de dólares na pesquisa e desenvolvimento de fármacos tanto para induzir quanto para reduzir a angiogênese, tornando-se uma das áreas mais fortemente financiadas de pesquisa médica (DEWITT, 2005).

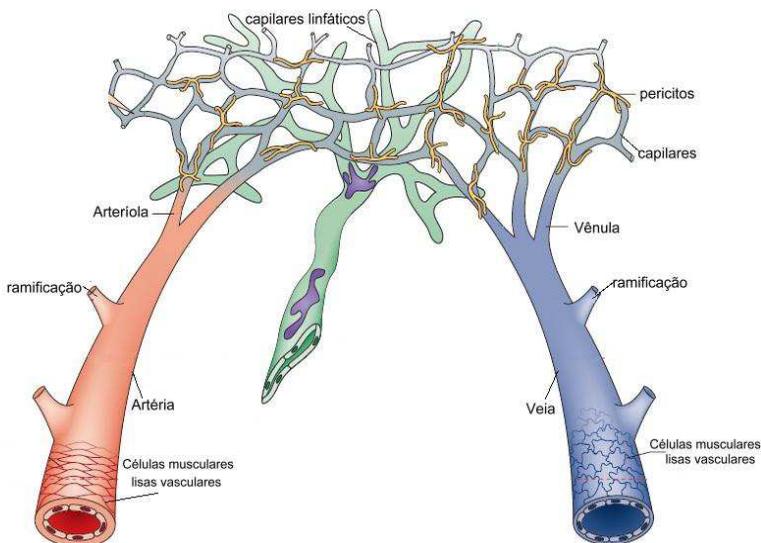
Portanto, para que haja inserção da própolis catarinense no abrangente conjunto de substâncias que exercem efeitos nos processos de formação de vasos sanguíneos, é necessário um amplo conhecimento científico acerca das propriedades desse produto apícola, uma vez que a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 24 de 14 de junho de 2010 (ANVISA), afirma que a própolis pode ser considerada um medicamento, desde que atingida as condições exigidas ao registro. Isso demanda inúmeros estudos bioquímicos, biológicos e farmacológicos subsidiados por metodologias adequadas, de modo que, no futuro, se alcance um conhecimento satisfatório ao enquadramento da própolis como fármaco.

1.4 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.4.1 Formação de vasos sanguíneos

Os vasos sanguíneos são formados por artérias, veias, arteríolas, vênulas e capilares. É importante esclarecer que capilares são tubos formados por células endoteliais as quais são suportadas pelos pericitos vasculares. As paredes finas dos capilares permitem a troca de substâncias entre o sangue e os tecidos do corpo. As artérias transportam o sangue do coração para outros órgãos. As grandes artérias elásticas originam-se no coração e dividem-se em artérias musculares de tamanho médio que se ramificam para as diversas regiões do corpo. As artérias de tamanho médio ramificam-se em artérias menores, chamadas arteríolas. À medida que as arteríolas entram em um tecido, ramificam-se em uma miríade de vasos minúsculos, chamados capilares. Grupos de capilares, no interior do tecido, reúnem-se para formar pequenas veias, chamadas vênulas. Estas por sua vez, se fundem para formar as veias, os quais são vasos sanguíneos que transportam o sangue para o coração (Figura 1; TORTORA, 2007). Os vasos linfáticos formam uma extensa rede com capilares de fundo cego que drenam o excesso de líquido intersticial dos tecidos. Essa linfa rica em proteínas é devolvida à circulação venosa através de ductos (ADAMS; ALITALO, 2007).

Figura 1 –Tipos de vasos sanguíneos

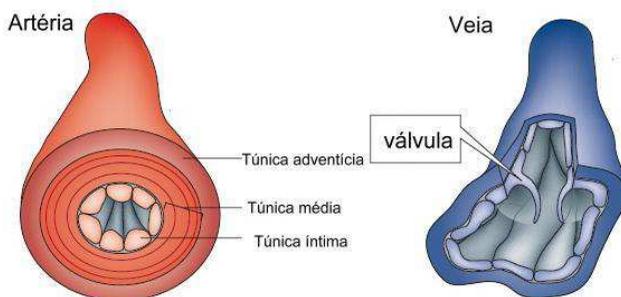


Fonte: Adaptada de Adams; Alitalo (2007, p. 465). Em vermelho há as artérias que se ramificam em arteríolas. Em azul há as veias que se ramificam em vênulas. Ambas, arteríolas e vênulas, se ramificam em vasos minúsculos, os capilares. Vasos linfáticos são ilustrados em verde.

Artérias e veias são vasos sanguíneos formados em múltiplas camadas onde, da profunda para superficial, tem-se: a camada íntima, a qual é composta por uma única camada de células endoteliais e uma membrana basal de sustentação; a camada média, composta principalmente de células musculares lisas e matriz extracelular; a camada adventícia ou externa, a mais larga, composta principalmente de fibroblastos e matriz extracelular (Figura 2; SEMENZA, 2007). A camada média é a mais variável uma vez que através da espessura podem-se distinguir artérias e veias em relação ao tamanho do lúmen do vaso, bem como através da presença de válvulas nas paredes (MOORE;

DALLEY, 2007). Diferenças na pressão sanguínea exercida nas paredes desses vasos também constituem características que permitem distingui-los.

Figura 2 - Camadas que constituem os vasos sanguíneos



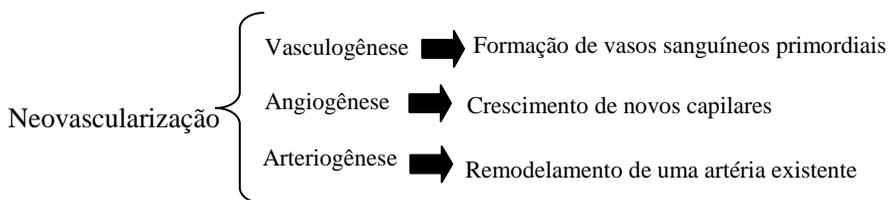
Fonte: Adaptada de Adams; Alitalo (2007, p. 471). A espessura da parede vascular, o lúmen do vaso e a presença de válvulas são características que distinguem artérias e veias.

As células endoteliais são células alongadas, de estrutura maleável, no interior da árvore vascular, podendo adquirir espessura inferior a $0,1\mu\text{m}$ em capilares e veias, a $1\mu\text{m}$ na aorta (AIRD, 2012). Essas células constroem canais que não colapsam e distribuem eficientemente sangue para várias partes do corpo. Possuem longevidade de diversos anos porém, quando estimuladas, são capazes de rapidamente produzir brotamentos de maneira coordenada e direcionada. Essas células conseguem desempenhar todas essas funções porque as células dentro da parede do vaso comunicam-se umas com as outras e com as células de dentro e de fora do lúmen. As células endoteliais detectam mudanças na pressão e fluxo sanguíneo e

interagem com o citoesqueleto interno e com a matriz extracelular circundante (CARMELIET, 2003).

Ao estudar a formação de vasos sanguíneos, uma das primeiras estruturas funcionais desenvolvidas no embrião, é importante que conheçamos os conceitos de neovascularização, angiogênese, arteriogênese e vasculogênese, além do período em que esses processos ocorrem no organismo vivo (Figura 3).

Figura 3 – Esquema dos tipos de neovascularização



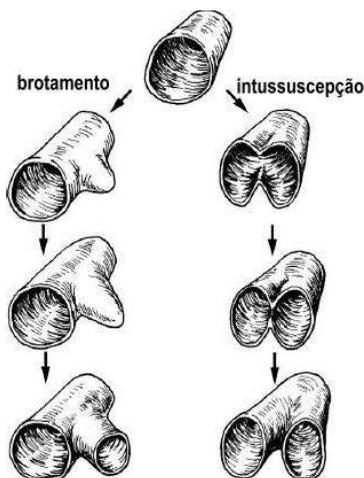
A neovascularização é definida como o crescimento de novos vasos sanguíneos que pode ocorrer como resultado de um ou mais processos distintos, como a vasculogênese, a angiogênese e a arteriogênese (TIRZIU; SIMONS, 2005).

Os primeiros vasos sanguíneos de um embrião são desenvolvidos por vasculogênese, processo no qual os hemangioblastos, células progenitoras endoteliais e hematopoiéticas, migram para os sítios de vascularização (SEMENZA, 2007). Nesses locais eles formam agregados celulares ou ilhotas sanguíneas nos quais a população celular interna diferencia-se em precursores hematopoiéticos e a população externa em células endoteliais (KUWANO et al., 2001; TIRZIU; SIMONS, 2005; WACKER; GERHARDT, 2011).

Após a formação da rede vascular primordial, ocorre o que Yancopoulos et al., (2000) denomina de “remodelamento angiogênico”, ou seja, essa rede inicial é modificada por meio da regressão ou alargamento de vasos para formar um padrão de ramos intercomunicantes, característica de uma vasculatura estabilizada e madura. Durante esse tempo, a parede dos vasos também amadurece. As células endoteliais ficam firmemente unidas às células de suporte subjacentes (células de músculo liso e pericitos) além de desenvolverem uma matriz extracelular circundante. Durante a vida adulta, essa rede vascular torna-se quiescente (redução das atividades de crescimento e desenvolvimento, ou seja, período de repouso) e estável podendo, contudo, sofrer processos de remodelamento.

O processo de angiogênese, portanto, refere-se ao remodelamento angiogênico que ocorre logo após a formação da rede vascular primordial (para um melhor entendimento observe a parte B da Figura 9, página 48) e ao crescimento de novos capilares (microvasos; parte F da Figura 9). A angiogênese ocorre em respostas protetoras (reparo tecidual), mas, também, em eventos como inflamação, hipóxia e isquemia (KUWANO et al., 2001; TIRZIU; SIMONS, 2005). Esse processo se dá por brotamento e intussuscepção (Figura 4; PRIOR; YANG; TERJUNG, 2004). Contudo, existe uma divergência entre autores, pois há os que consideram ainda a existência de um terceiro processo de angiogênese: o crescimento longitudinal (GIBBONS, 2010). Para estes autores, o conceito de angiogênese por crescimento longitudinal é muito similar ao conceito o qual, outros autores, atualmente empregam para se referir à intussuscepção.

Figura 4 – Processos de angiogênese

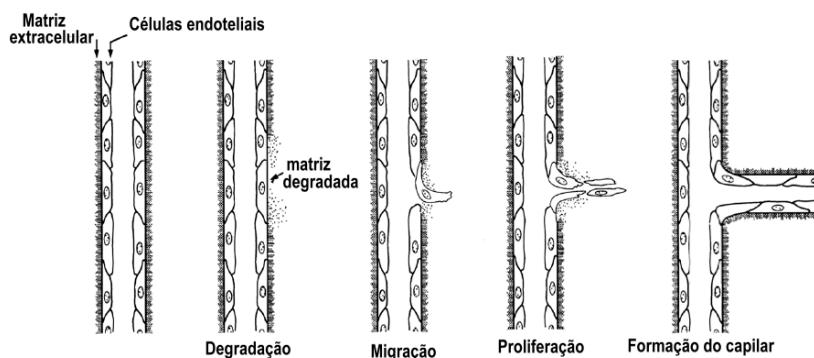


Fonte: Adaptada de Prior; Yang; Terjung (2004, p. 1120). A angiogênese pode ocorrer por brotamento (lado esquerdo da figura) ou por intussuscepção (lado direito da figura). Em ambos os movimentos morfogenéticos há aumento do número de microvasos. Recentes evidências têm sugerido que a intussuscepção pode ser o meio principal de formação de capilares durante o desenvolvimento.

Em relação ao processo de angiogênese, o brotamento é o movimento morfogenético mais estudado e envolve várias etapas (Figura 4; GIBBONS, 2010). O brotamento ocorre quando, partindo de um capilar existente, as células endoteliais ativadas formam estruturas semelhantes a cordões que se estendem sobre uma matriz extracelular distinta (DJONOV; GALLI; BURRI, 2000). Ele depende inicialmente da ativação celular endotelial, degradação da lâmina basal (através da secreção de proteases permitindo a entrada no espaço perivascular), migração e proliferação de células endoteliais, tubulogênese e maturação vascular através do recrutamento de pericitos e células musculares lisas que resultará no surgimento do novo vaso (Figura 5;

PHILLIPS et al., 1991; YANCOPOULOS et al., 2000; JONES et al., 2001; KALLURI, 2003; CHUNG; FERRARA, 2010; XU; CLEAVER, 2011; POTENTE et al., 2011; RIBATTI; CRIVELLATO, 2012; HERBERT; STAINIER, 2012).

Figura 5 - Etapas envolvidas na angiogênese por brotamento



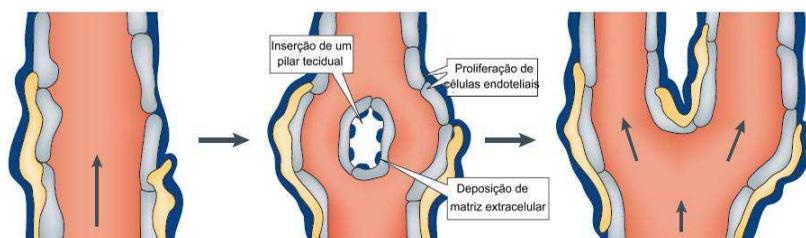
Fonte: Adaptada de Bischoff (1995, p. 70). Etapas envolvidas no brotamento angiogênico. Tem início com a degradação da lâmina basal permitindo que as células migrem, proliferem e formem novos capilares. Uma vez formado o capilar, ocorre deposição de nova lâmina basal.

O termo intussuscepção significa “crescendo por si só” (DJONOV; GALLI; BURRI, 2000) e refere-se ao movimento morfogênético no qual um único capilar divide-se em dois capilares de dentro para fora, por meio da formação de uma estrutura semelhante a um pilar longitudinal sobre o lado luminal. Células endoteliais ativadas estendem-se intraluminalmente, formando dois tubos através dos quais o sangue pode passar (Figura 6). Trata-se de um processo muito eficiente para a multiplicação de capilares, o qual requer menor proliferação

celular endotelial e oferece maior simplicidade na remodelação da matriz extracelular, quando comparado à angiogênese por brotamento (PRIOR; YANG; TERJUNG, 2004).

Nos músculos esqueléticos, a superexpressão do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), desencadeia o crescimento vascular mais por intussuscepção do que por brotamento. O fluxo sanguíneo e o estresse de cisalhamento existente são potentes desencadeadores da intussuscepção (GIANNI-BARRERA et al., 2013). A partir de estudos utilizando modelos computacionais, verificou-se que as redes intussusceptivas são mais eficazes no fornecimento de oxigênio sob condições de alta demanda metabólica. Além disso, a intussuscepção tem o potencial para proporcionar um alívio funcional mais rápido em condições de isquemia (JI et al., 2006).

Figura 6 - Crescimento intussusceptivo



Fonte: Adaptada de Adams; Alitalo (2007, p. 469). Na intussuscepção ocorre o crescimento de um pilar longitudinal no lúmen capilar, dividindo-o em dois. Requer menor proliferação celular endotelial. Ao final do processo há a divisão de um único vaso em outros dois capilares.

O termo arteriogênese refere-se ao processo de remodelamento de uma artéria existente para aumentar o diâmetro luminal em resposta a

um fluxo sanguíneo aumentado (HEIL et al., 2006; DEVEZA; CHOI; YANG, 2012). Um importante estimulador da arteriogênese é o aumento do estresse de fluido no sítio proximal da oclusão arterial e o subsequente acúmulo de células mononucleares (TIRZIU; SIMONS, 2005). De acordo com Heil et al., (2006), devido às leis físicas da mecânica dos fluidos, apenas a arteriogênese fornece uma resposta equivalente a déficits de fluxo de sangue causadas por oclusões arteriais.

Durante o desenvolvimento do embrião existe um aumento na demanda de oxigênio e os tecidos secretam moléculas sinalizadoras que estimulam a proliferação, a migração e a diferenciação de células endoteliais, o que resulta no surgimento de uma rede vascular em um tecido previamente avascular. A vasculogênese, primordialmente, e a angiogênese são responsáveis pelo desenvolvimento dessa rede (BISCHOFF, 1995).

Uma vez formada a rede vascular no adulto, as células endoteliais permanecem quiescentes ou proliferam em um ritmo muito lento. Estima-se que em um organismo adulto somente 0,01% das células endoteliais encontram-se normalmente em processo de divisão, valor bastante diferente daquele observado em outros epitélios (HANAHAN; FOLKMAN, 1996). Contudo há casos em que esta estável rede vascular sofre remodelamento, como em doenças, durante a regeneração tecidual e no processo reprodutivo (BISCHOFF, 1995; KUWANO et al., 2001). As células endoteliais atuam também na formação de uma barreira que exerce função importante na integridade dos tecidos através da regulação de passagem de moléculas, líquidos e células imunes (RAZAKANDRAINIBE et al., 2013). Um exemplo é o extravasamento

leucocitário, no qual ocorrem mudanças na superfície do endotélio através do aumento da expressão de moléculas de adesão, como a P-selectina e a E-selectina. A transmigração de um leucócito pode acontecer de forma paracelular (entre células endoteliais) ou transcelular (através de células endoteliais individuais). A interrupção ou disfunção dessa barreira leva ao edema, inflamação e patologias associadas (KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013).

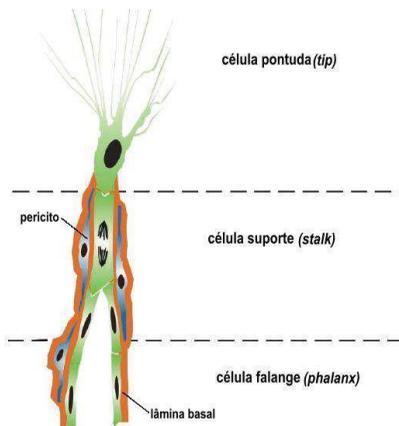
A célula endotelial de veia umbilical humana (HUVEC) é uma célula altamente dinâmica, pois, além de mostrar capacidade angiogênica, participa ativamente na regulação do tônus vascular (através da produção de substâncias como óxido nítrico e prostaglandinas, pelas enzimas eNOS e COX, respectivamente), responsável pelo tráfego de células sanguíneas entre o sangue e tecidos, manutenção da fluidez do sangue, permeabilidade, imunidade inata e adaptativa (AIRD, 2012). Além disso, essas células já mostraram serem dotadas de alto grau de plasticidade (MAURO; BUSCEMI; GERBINO, 2010), podendo detectar sinais angiogênicos e responder.

Atraídas por sinais pró-angiogênicos, as células endoteliais também podem tornar-se móveis e invasivas através da formação de prolongamentos citoplasmáticos longos e delgados, os filopódios. Estes prolongamentos contêm filamentos de actina, os quais, através de contração, impulsionam a célula para frente. Afastando-se da origem do broto no sentido distal, essas células denominadas “pontudas” (*tip cells*) guiam os novos brotamentos e exploram o ambiente buscando os sinais pró-angiogênicos para a respectiva orientação (Figura 7). Seguindo as células-*tip* há as células “suporte” (*stalk cells*) que estendem menos

filopódios, mas estabelecem um lúmen e proliferam para suportar o alongamento do brotamento (Figura 7). Há ainda uma terceira classificação, que são as células "falanges" (*phalanx cells*) que se alinham em monocamada, formando a camada mais interna do novo vaso sanguíneo, onde não ocorre mais proliferação. As células-*tip* anastomosam-se com brotamentos vizinhos para construir redes vasculares. O início do fluxo sanguíneo, o estabelecimento de uma membrana basal e o recrutamento de células perivasculares de suporte e formação das junções *gap*, estabilizam as novas conexões. O processo de brotamento ocorre até que os sinais pró-angiogênicos diminuam e a quiescência é então reestabelecida (Figura 7; POTENTE et al., 2011; RIBATTI; CRIVELLATO, 2012; SIEMERINK et al., 2012).

No tecido normal (não-patológico), para uma formação ordenada de vasos sanguíneos, as células endoteliais recebem sinais provenientes de angiocininas secretadas localmente por vários tipos celulares como células do tecido conjuntivo e das próprias células endoteliais, mas podem também derivar do sangue e da matriz extracelular (LIECKENS; CLERCQ; NEYTS, 2001; COULTAS; CHAWENGSAKSOPHAK; ROSSANT, 2005). Após o recebimento desse sinal inicial, o endotélio secreta enzimas específicas, como as metaloproteinases (MMPs), que resulta na degradação da membrana basal que contém várias proteínas da matriz extracelular (MEC). Subsequentemente, essa degradação é seguida pelas mudanças sequenciais vasculares das células endoteliais. As células endoteliais podem então projetar-se através dos novos espaços criados e organizar novos tubos de capilares que crescem em direção à fonte de suprimento sanguíneo (ESFAHANIAN et al., 2012).

Figura 7 - Diferenciações da célula endotelial durante a angiogênese



Fonte: Adaptada de Siemerink et al., (2012, p.103). Através dos sinais angiogênicos, as células endoteliais podem se diferenciar em três tipos de acordo com a sua posição no vaso sanguíneo: *tip*, *stalk* e *phalanx*.

Por outro lado, no estroma tumoral, a angiogênese é caracterizada pela expressão de proteínas pró-angiogênicas, coordenada pelos oncogenes (neoangiogênese). A formação da nova rede vascular ocorre em etapas sequenciais. As células precisam proliferar, migrar e penetrar no "estroma hospedeiro". A rede vascular de muitos tumores não é idêntica à do tecido normal, podendo resultar em microvasos irregulares e tortuosos os quais são parcialmente revestidos com endotélio e membrana basal. Nessas condições, derivações arteriovenosas com fundo cego são comuns (CARMELIET; JAIN, 2000; AIRD, 2012). Um pré-requisito para a progressão do tumor é o recebimento de nutrição e oxigênio através do fluxo sanguíneo. Quando a massa tumoral alcança cerca de 1 a 2 mm³, a difusão de oxigênio e nutrientes através das células é dificultada, pois difusão pode ocorrer a

partir dos capilares a uma distância de apenas 150 a 200 μm . Desse modo, forma-se um centro de hipóxia/necrose dentro do tumor em crescimento. Portanto, a expansão da massa tumoral depende do desenvolvimento de novas redes de suprimento sanguíneo, tornando evidente o fato de que a angiogênese é essencial para a progressão do tumor (CARMELIET, 2005; FOLKMAN, 2007).

Em condições fisiológicas como reprodução, desenvolvimento embrionário e regeneração tecidual, a angiogênese é um processo altamente controlado, ou seja, é desencadeada por breves períodos e em seguida é completamente inibida (KUWANO et al., 2001; CARMELIET, 2003). Entretanto, em condições patológicas, o crescimento de novos vasos sanguíneos pode vir a ser anômalo, tornando-se um fator importante para a patogênese em doenças caracterizadas por uma angiogênese excessiva (FOLKMAN, 1974; RISAU, 1997; PANDYA; DHALLA; SATANTI, 2006). Entre essas doenças angiogênicas podemos citar, além do crescimento tumoral, a retinopatia diabética, a psoríase, a artrite reumatóide, a obesidade, a endometriose e outras condições crônicas nas quais a angiogênese sustentada contribui para o seu desenvolvimento (BISCHOFF, 1995; CARMELIET, 2003; EVCIMENT; KING, 2007; FOLKMAN, 2007; HEIDENREICH; RÖCKEN; GHORESCHI, 2009; RODRÍGUEZ-CASO et al., 2012).

Estudos recentes sugerem que os processos de inflamação e angiogênese estão inter-relacionados. Os vasos sanguíneos recém-formados permitem o recrutamento contínuo de células inflamatórias, as quais liberam uma variedade de citocinas pró-angiogênicas,

quimiocinas e fatores de crescimento promotores da angiogênese. Estas séries de *feedbacks* positivos, por fim, criam um círculo vicioso que exacerba a inflamação, transformando-a em um processo crônico (KIM; WEST; BYZOVA, 2013). Evidências convincentes indicam que angiogênese e inflamação são componentes essenciais para a manutenção de uma variedade de condições patológicas, características de morbidades crônicas (MOURA et al., 2009).

Na retinopatia diabética, ocorre vascularização da retina devido à obliteração dos capilares, uma das disfunções vasculares encontradas nessa doença, sendo a hiperglicemia o principal fator relacionado às mudanças estruturais e funcionais. Essa obstrução vascular promove perfusão inadequada da retina e isquemia, a qual estimula a angiogênese. Uma suprarregulação de diversos mediadores pró-inflamatórios produzidos pelas próprias células da retina pode ser induzida através da hiperglicemia continuada, devido à perda capilar e vasoconstricção, característicos dessa doença (BANDELLO et al., 2013).

Da mesma forma, na psoríase há aumento da vasculatura dermal com capilares dilatados e alongados, com diversos mediadores angiogênicos suprarregulados. Fatores derivados de queratinócitos, mastócitos e outras células imunes contribuem para a angiogênese sendo que, nessas condições patológicas, ela é necessária, uma vez que trata-se de uma condição inflamatória crônica (HEIDENREICH; RÖCKEN; GHORESCHI, 2009).

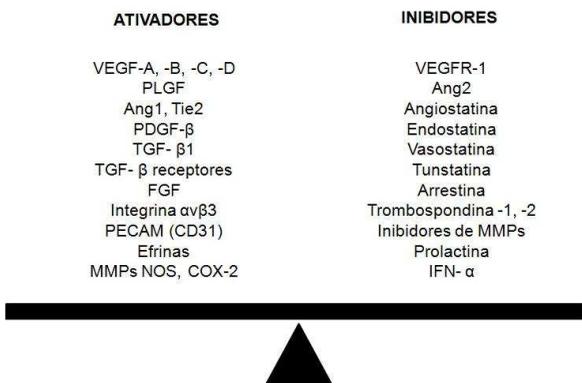
Portanto o "disparo angiogênico" (WANG; DUBOIS, 2004) na maioria dos distúrbios crônicos parece ser ativado quando ocorrem

mudanças no balanço entre inibidores e estimuladores angiogênicos (SAGAR; YANCE; WONG, 2006).

1.4.2 Fatores inibidores e estimuladores da angiogênese

As células requerem sinais extracelulares para proliferação e sobrevivência. A maioria das moléculas de sinalização extracelulares que influenciam a divisão celular, o crescimento e a sobrevivência das células endoteliais são proteínas solúveis. Todo o processo de neovascularização é criteriosamente controlado nos tecidos normais por uma sequência de polipeptídeos endógenos e angiogênicos, que são secretados durante o crescimento, reparo e renovação tecidual (SAGAR; YANCE; WONG, 2006). Os fatores conhecidos até o momento estão listados na Figura 8.

Figura 8 –Ativadores e inibidores da angiogênese mais conhecidos



Fonte: Adaptada de Mundell; Kalluri (2007, p.2). Com o avanço das pesquisas na área de angiogênese, esta lista de fatores ativadores e inibidores vem crescendo proporcionalmente.

Quando os fatores de crescimento angiogênicos são produzidos em excesso, o balanço se dá a favor do crescimento de vasos sanguíneos. Quando os inibidores estão presentes em excesso, a angiogênese é bloqueada. Em condições normais, há a manutenção de um equilíbrio de moduladores. Em geral, a angiogênese é, com frequência, não desencadeada, com mais inibidores sendo produzidos do que fatores ativadores (PANDYA; DHALLA; SATANTI, 2006).

A rede vascular primária, organizada no processo de vasculogênese, consiste apenas em células endoteliais. A maturação dos vasos sanguíneos requer a presença de diversos fatores angiogênicos de modo que as células endoteliais possam receber o revestimento de células-suporte perivasculares (pericitos) e matriz extracelular. Quando fatores pró-angiogênicos, tais como fatores de crescimento, angiopoietinas e MMPs estão presentes, os tubos das células endoteliais permanecem descobertos, ou seja, não mantêm um revestimento de matriz extracelular e de células perivasculares de suporte. Esta condição é requerida para que ocorra a proliferação e a migração celular, e formação de um microvaso por angiogênese. Por outro lado, esta é a mesma condição que pode promover a regressão do vaso desestabilizado (apoptose de células endoteliais; *anoikis*) devido à sua estrutura frágil, sujeita, inclusive, a rupturas. Este segundo destino (regressão) pode advir de predominância de fatores antiangiogênicos no mesmo cenário da angiogênese, a exemplo da ausência de fluxo sanguíneo ou da presença de sangue no ambiente extravascular (hemorragia), juntamente com moléculas inibidoras de angiogênese como trombospondina-1 e interferons (Figura 8; CARMELIET, 2003). Portanto, as interações entre

pericitos e células endoteliais resultam na expressão de inibidores teciduais de MMPs (TIMPs), reduzindo a proteólise e subsequentemente estabilizando os vasos (SIEMENRINK et al., 2012). Dessa forma, a atividade angiogênica é determinada pela desproporção entre fatores pró- e antiangiogênicos (KUWANO et al., 2001; MUNDELL; KALLURI, 2007).

Dentre os agentes ativadores endógenos, destaca-se a família das MMPs, que consiste em 26 membros. No processo de angiogênese, as MMPs têm função pró-angiogênica por aumentar a disponibilidade de fatores como o fator de crescimento de fibroblasto básico (FGFb), o fator de crescimento transformante (TGF- β), o VEGF e outros fatores angiogênicos através da degradação de componentes extracelulares, tais como o colágeno tipo IV, que se liga a esses fatores residentes da matriz (SIEMERICK et al., 2012); mas também antiangiogênica, associada à clivagem de componentes da matriz extracelular e geração de peptídeo com ação antiangiogênica. As MMP-2, 9 e 14 regulam diretamente a angiogênese (CHANG; WERB, 2001). Elas contribuem para a degradação e reorganização dos componentes da MEC. As isoformas, MMP-2 e MMP-9 são expressas predominantemente em células endoteliais e estão diretamente envolvidas na migração celular endotelial e remodelamento vascular durante a angiogênese (ESFAHANIAN et al., 2012). Ambas as MMPs são requisitadas em processos fisiológicos como remodelamento da MEC durante o crescimento e o desenvolvimento, reparo de lesões, angiogênese e extravasamento leucocitário. Elas estão também envolvidas em processos fisiopatológicos tais como câncer e doenças degenerativas

neurais e vasculares (SHIRVAIKAR et al., 2011). Recentemente, foi demonstrado que compostos naturais têm a capacidade de diminuir a expressão de MMP-2 e MMP-9, como é o caso da proantocianidina, que reduz de forma dose-dependente a atividade dessas proteinases (HUANG et al., 2012).

Outro fator de crescimento muito conhecido e com grande especificidade para células endoteliais é o VEGF, uma família de cinco membros: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e VEGF-E (YANCOPOULOS et al., 2000). O VEGF foi descrito como um fator de crescimento endotelial bem como um regulador da permeabilidade vascular, sendo originalmente denominado de fator de permeabilidade vascular (FPV). Em particular, a isoforma VEGF-A é capaz de induzir a proliferação, o brotamento e a tubulogênese de células endoteliais. Ela é expressa na maioria das células, mas está suprarregulada na hipóxia. Em tumores, por exemplo, o VEGF é produzido pelas células tumorais hipoxêmicas, pelas células endoteliais e por macrófagos associados ao tumor (WELSH; WELSH, 2013). O VEGF-A já mostrou ser capaz de induzir a expressão de MMP-2 e MMP-9. Em contrapartida, o VEGF-C e VEGF-D estão envolvidos no desenvolvimento e manutenção de vasos linfáticos (CHUNG; FERRARA, 2010).

Membros da família VEGF ligam-se e sinalizam através de três receptores do tipo tirosina quinase: VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (KDR) e VEGFR-3. As respostas angiogênicas *in vivo* do VEGF-A são mediadas pela ativação de VEGFR-2, enquanto que o VEGFR-1 parece ter uma atuação negativa através da supressão da sinalização de VEGFR-2 (Figura 8). O VEGFR-3 é o único receptor cuja expressão

ocorre nos vasos linfáticos. O VEGF é um potente regulador vascular e a sua concentração deve ser altamente regulada espacial, temporal e quantitativamente para evitar erros nas estruturas vasculares. Apesar da sua especificidade na organização do sistema vascular, o VEGF deve atuar em conjunto com muitos outros fatores angiogênicos (YANCOPOULOS et al., 2000; WELSH; WELSH, 2013).

Outra superfamília muito conhecida é o FGF, composta por elementos envolvidos no processo de vascularização, apesar de suas ações não serem específicas apenas do endotélio. O FGF-2 ou FGFb é um membro dessa família e está ligado a moléculas de glicosaminoglicanas (GAGs) na matriz extracelular, como o sulfato de heparana. Essa ligação eventualmente aponta para um complexo mecanismo bioquímico de regulação desse fator de crescimento (YAYON et al., 1991).

Quase todas as GAGs estão ligadas a proteínas, com as quais formam glicoproteínas complexas, as proteoglicanas. As proteoglicanas formadas pelo sulfato de heparana, encontradas na superfície celular e na matriz extracelular, interagem com o FGFb modulando a sua distribuição e sua função (IOZZO, 1998). A atividade angiogênica do FGFb é atribuída à ativação de receptores de tirosina quinases (BIKFALVI et al., 1997). Alterações na interação FGFb – matriz extracelular promovidas por proteoglicanas, a partir de sua degradação proteolítica, podem aumentar a liberação de moléculas de FGFb dos seus sítios da matriz extracelular. Além disso, proteoglicanas podem aumentar significativamente a afinidade do FGFb pelo respectivo receptor (NUGENT; IOZZO, 2000).

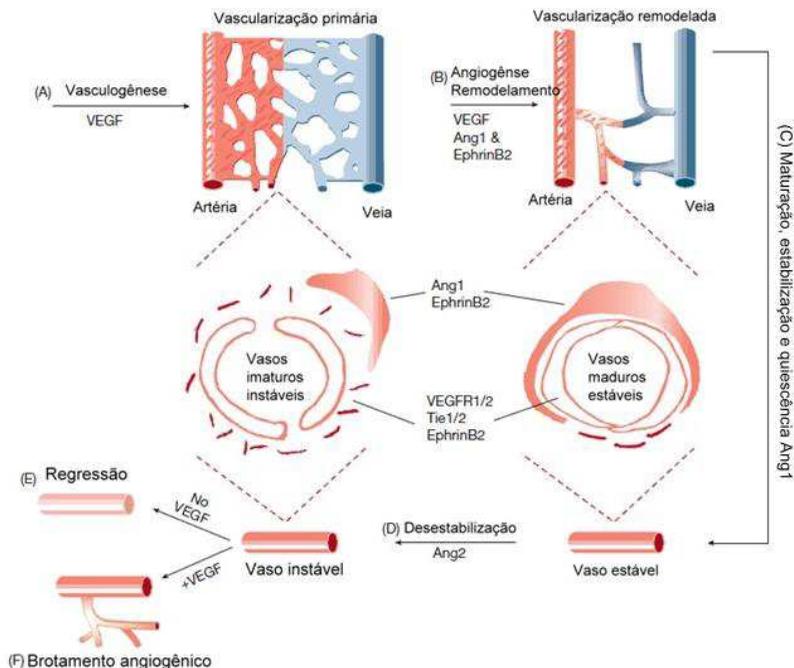
As angiopoietinas são outra família composta por quatro isoformas (Ang1, Ang2, Ang3 e Ang4), ligantes dos receptor *Tie*, expresso no endotélio vascular, porém parecem ligar-se exclusivamente ao receptor tirosina quinase *Tie2*. Curiosamente, esses ligantes parecem ter ações opostas nas células endoteliais. A Ang1 e a Ang4 atuam como agonistas, ou seja, ativadores do receptor *Tie2*, enquanto a Ang2 e Ang3 comportam-se como antagonistas (JONES et al., 2001).

A Ang1 possui uma atuação importante na estabilização da parede dos vasos sanguíneos. Ela não apenas fornece sinais que organizam os eventos específicos de remodelação vascular, mas também atua maximizando a interação entre células endoteliais com as células de suporte e matriz extracelular (SURI et al., 1996; SIEMERINK et al., 2012).

A Ang2 parece ser requisitada em eventos de remodelação vascular através da promoção da desestabilização da vasculatura, necessária para subsequente remodelação angiogênica (parte D da Figura 9; YANCOPOULOS et al., 2000). Convém comentar que a expressão e atividade de fatores angiogênicos tais como a Ang1, têm grande variação nos diferentes tecidos. Por exemplo, a Ang1 estimula a angiogênese na pele, mas suprime o crescimento vascular no coração (CARMELIET, 2003). A produção de Ang2 pelas células endoteliais estimula a angiogênese na presença de VEGF. Ela exerce um papel importante na angiogênese retiniana (fisiológica e patológica). Recente estudo identificou ainda uma superexpressão de Ang2 em células-*tip* (SIEMERINK et al., 2012).

O receptor de tirosina quinase, Eph, compreende uma família conhecida de receptores de fatores de crescimento e usam várias efrinas como ligantes. Esses receptores estão ancorados à superfície da célula. A efrina B2 exerce importantes papéis no desenvolvimento vascular e angiogênese pós-natal (SALVUCCI; TOSATO, 2012). Embora inicialmente caracterizado no sistema nervoso, estudos em modelos *knockout* têm sugerido papéis para o ligante efrina B2 e seu receptor EphB4 durante o desenvolvimento vascular. Eles revelam um padrão de distribuição recíproco, com a efrina B2 marcando o endotélio de vasos arteriais primitivos enquanto o receptor EphB4 marca o endotélio de veias primitivas. Essas distribuições sugerem que a efrina B2 e o receptor EphB4 estão envolvidos no estabelecimento da identidade vascular arterial ou venosa (Figura 9; YANCOPOULOS et al., 2000). Sabe-se que as células endoteliais arteriais e venosas são molecularmente distintas nos estágios iniciais da angiogênese. Essa distinção ocorre pela expressão, nas células arteriais, do ligante efrina B2 cujo receptor, EphB4, é expresso sobre células venosas. O bloqueio do gene *efrina B2* previne o remodelamento de veias, bem como, também, interrompe o remodelamento de artérias, sugerindo que interações recíprocas entre células endoteliais arteriais e venosas são necessárias para a angiogênese (WANG; CHEN; ANDERSON, 1998).

Figura 9 – Atuação de fatores angiogênicos na vasculogênese e angiogênese



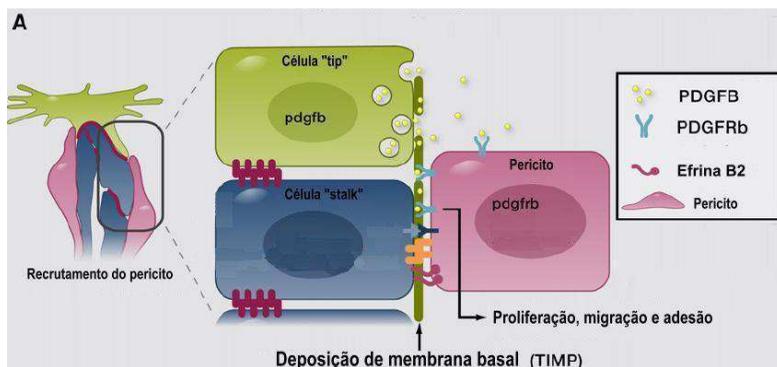
Fonte: Adaptada de Yancopoulos et al., (2000, p. 244). Ilustração da atuação do VEGF, Ang1/2 e efrina B2 no desenvolvimento da vascularização primária, no remodelamento angiogênico e na posterior estabilização ou regressão do vaso sanguíneo.

O fator de crescimento placentário (PIGF), um homólogo do VEGF, contribui para o disparo (*switch*) angiogênico crucial em numerosas doenças (CARMELIET et al., 2001; BOCK; CAUWENBERGHS; CARMELIET, 2011). O PIGF aumenta o crescimento colateral, não apenas porque recruta monócitos no microambiente vascular, mas também porque ao competir com o VEGF-A pelo receptor VEGFR-2, estimula diretamente o crescimento de

células endoteliais e células musculares lisas por promover maior ligação de VEGF-A em sítios de VEGFR-2. Os monócitos expressam fatores de crescimento e proteinases de matriz, os quais permitem a migração e a divisão celular (LUTTUN et al., 2002).

Outro fator de crescimento de grande importância é a isoforma β do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF- β), secretado pelas células endoteliais e, juntamente com seu receptor PDGFR- β , tem papéis importantes na estabilização de vasos sanguíneos primários através do recrutamento de pericitos (Figura 10; POTENTE et al., 2011). Embriões desprovidos de PDGF- β exibem fragilidade vascular, vasodilatação, perda sanguínea com perfusão defeituosa e hipóxia (HELLSTROM et al., 2001).

Figura 10 – Disposição de um pericito justaposto à célula endotelial

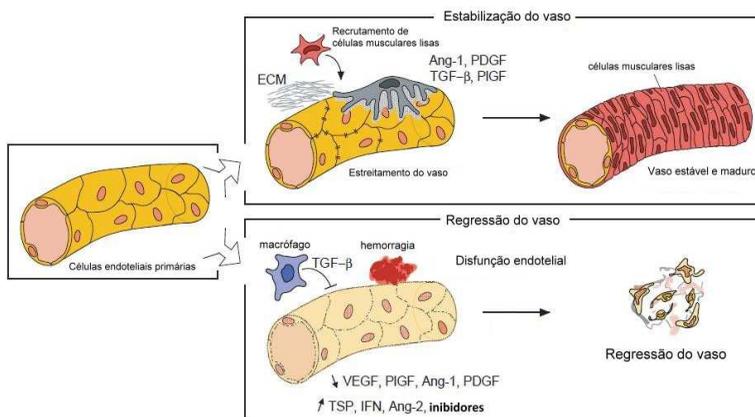


Fonte: Adaptada de Potente et al., (2011, p. 879). A maturação vascular depende do recrutamento de pericitos envolvendo PDGFR- β , efrina B2 e outros fatores sinalizadores. O depósito da membrana basal é favorecido através dos inibidores de metaloproteinases (TIMP).

Outras moléculas são capazes de regular o crescimento endotelial, incluindo membros da superfamília do TGF- β , quimiocinas, citocinas [interleucina-8, interleucina-17 e fator de necrose tumoral (TNF)], mediadores lipídicos, hormônios e neuropeptídeos (KERBEL; FOLKMAN, 2002; CARMELIET, 2003). A angiogênese pode, ainda, ser induzida por isquemia, uma resposta fisiológica do tecido à hipóxia, definida como a redução na concentração de O₂ no ambiente. A maioria dos tecidos respondem à hipóxia por meio do fator de indução de hipóxia 1- α (HIF-1 α). Ele induz a liberação de VEGF, PDGF- β , PIGF, Ang 1 e MMPs (HADJIPANAYI; SCHILLING, 2013).

Uma característica fundamental da maturação do vaso é o recrutamento de células suporte. Essas células são referidas como pericitos e células musculares lisas vasculares, que estabilizam e contribuem para a maturação de novas redes vasculares. Os pericitos estão associados principalmente com vasos de pequeno calibre (capilares) e as células musculares lisas vasculares com vasos maiores como as artérias e veias (HERBERT; STAINIER, 2012). Portanto, a maturação vascular depende da sinalização do TGF- β , o qual estimula a indução, a diferenciação, a proliferação e a migração de células de suporte e promove a produção de matriz extracelular (POTENTE et al., 2011). O contato e a interação entre células endoteliais e células suporte levam à ativação de TGF- β , o qual estimula a gradual organização da membrana basal, para a estruturação dos vasos recém- formados (Figura 11; CHUNG; FERRARA, 2010).

Figura 11 - Maturação e regressão do vaso sanguíneo



Fonte: Adaptada de Carmeliet, (2003, p.656). A estabilização do vaso é importante para a passagem do fluxo sanguíneo e envolve a presença de Ang1, PDGF- β , TGF- β e PIGF que irão requisitar células de suporte e MEC (quadro superior). Quando os inibidores da angiogênese estão presentes, os canais endoteliais permanecem sem revestimento, frágeis, podendo romper e levar à regressão do vaso (quadro inferior).

É importante destacar que ambas as propriedades pró e anti-angiogênicas têm sido relacionadas ao TGF- β 1 através de efeitos sobre células endoteliais e outros tipos celulares (GUDJONSSON et al., 2007). Em baixas concentrações, o TGF- β 1 contribui para a angiogênese através da expressão de fatores pró-angiogênicos e proteinases; contudo, em altas concentrações, o TGF- β 1 inibe o crescimento de células endoteliais (CARMELIET, 2003). Conflitos nesse campo de pesquisa aparecem com certa frequência, talvez devido à variedade de linhagens celulares e métodos experimentais usados em cada estudo (GIBBONS, 2010).

Outros compostos que também despontam, desempenhando ações inibidoras ou estimuladoras sobre a angiogênese são os produtos

naturais (DIAS et al., 2005; SAGAR; YANCE; WONG, 2006; DIAS et al., 2008a; DALEPRANE et al., 2012; LU et al., 2012), os quais podem constituir-se em agentes biologicamente ativos para o tratamento de distúrbios angiogênicos.

Há uma gama de produtos naturais que não estão listados na Figura 8 e que tiveram sua atividade antiangiogênica demonstrada mais recentemente, são exemplos: secreções glandulares, como a melatonina (ALVAREZ-GARCIA et al., 2013), proantocianidinas (HUANG et al., 2012), quercetina (PRATHEESHKUMAR et al., 2012), flavonóides de frutas cítricas como nobiletina (LAM et al., 2011), resveratrol (DIAS et al., 2008a; CHEN; EASTON, 2011), *Artemisia annua*, *Viscum album*, *Curcuma longa*, *Ginkgo biloba*, *Panax ginseng*, *Camellia sinensis*, dentre outros. Os produtos naturais contêm uma variedade de compostos químicos que podem exercer atividade sinérgica. Eles podem inibir a angiogênese, interagindo em múltiplas vias, de maneira que podem afetar a sinalização celular, a via apoptótica e a interação entre células e o sistema imunológico (SAGAR; YANCE; WONG, 2006).

No contexto acima, a própolis, uma substância resinosa que as abelhas coletam e sintetizam a partir dos exsudatos de plantas, é um produto natural que já demonstrou, em vários estudos, atividade inibitória da angiogênese em estudos *in vivo* e *in vitro*.

1.4.3 Mecanismos de sinalização da angiogênese

Os mecanismos que desencadeiam a angiogênese envolvem um grande número de proteínas efetoras incluindo as quinases reguladas por

sinais extracelulares (ERK1/2), fosfoinositol 3 quinase (PI3K/Akt), quinase de adesão focal (FAK), óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK). Esta última exerce papéis fundamentais na regulação da angiogênese, tais como a estimulação da proliferação celular, migração e tubulogênese (Figura 12). As ERKs já mostraram papéis importantes na sobrevivência e migração de células endoteliais (TSUCHIYA et al., 2013). Além dessas, outras proteínas conhecidas por atuarem na transdução de sinais de proliferação, diferenciação, migração e tubulogênese vascular têm sido estudadas quanto à ação patogénica em distúrbios vasculares. Dentre estas destacam-se a proteína quinase C (PKC), NOS, p38, p53, Akt, Bcl-2, Bax, caspase-3, dentre outras (SCHAAN, 2003; ZHAG; HUANG; XU, 2004; KUNIMASA et al., 2009).

O receptor VEGFR-2 exerce uma importante ação na mitose e permeabilidade de células endoteliais. A ativação desse receptor contribui para a fosforilação de múltiplas vias de sinalização que incluem ERK, JNK, PI3K, Akt, P70S6K e p38MAPK que subsequentemente promovem a proliferação, a migração e a tubulogênese de células endoteliais (Figura 12, FERRARA et al., 2003).

A fosfolipase C (PLC) é um mediador importante da proliferação dependente de VEGFR-2. PLC é ativada após a fosforilação de VEGFR-2, resultando em hidrólise do fosfatidil inositol-4,5 bifosfato (PIP₂). A hidrólise de PIP₂ gera inositol 3,4,5 trifosfato (IP₃) e fluxos de Ca²⁺, bem como diacilglicerol, o qual ativa a PKC, seguida pela indução da atividade de ERK1 e ERK2 que culmina em proliferação. O bloqueio da PKC, através da utilização de inibidores farmacológicos, reduz a

tubulogênese induzida por VEGF em co-culturas de HUVEC e fibroblastos (GLIKI; WHEELER-JONES; ZACHARY, 2002).

A PKC é uma família de enzimas multifuncionais envolvidas na apoptose, migração e adesão celular, gênese tumoral, angiogênese, função plaquetária e inflamação. Essas enzimas também exercem importante papel na transdução de sinal, proliferação celular e diferenciação através de regulação do ciclo celular (SOBHIA et al., 2013). Dentre as isoformas identificadas constam: α , β I, β II, γ , δ , ϵ , θ e η ¹⁶⁻¹⁹. Muitas destas estão presentes dentro de uma mesma célula e são ativadas por meio do mesmo estímulo. As isoformas δ , ϵ , θ e η são ativadas pelo diacilglicerol, embora quatro isoformas convencionais (PKC α , β I, β II e γ) também requerem o Ca^{2+} para sua ativação. Ativação aumentada de isoformas de PKC tem sido observada no câncer, diabetes, doença cardíaca, insuficiência pulmonar e renal, psoríase e doenças auto-imunes (MOCHLY-ROSEN; DAS; GRIMES, 2012).

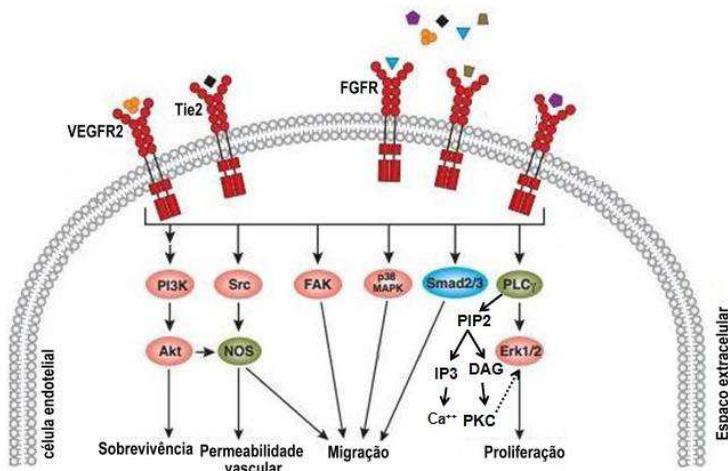
A PI3K é outro importante regulador da angiogênese. O VEGF-A ativa a PI3K através de diversas vias, sendo uma delas a FAK. PI3K tem sido relacionada à formação de estruturas tubulares *in vitro* por células endoteliais e, em proliferação, sobrevivência e permeabilidade vascular. A Akt, por sua vez, consiste numa molécula intermediária da sinalização após a PI3K, sendo um elemento de considerável importância na regulação da célula endotelial pelo VEGF. A forma ativa da Akt tem sido relacionada à angiogênese através da ação nos eventos de sobrevivência. A ativação da eNOS contribui para a permeabilidade vascular pela produção de óxido nítrico (NO) seguido de vasodilatação.

Constitutivamente, a Akt na sua forma ativa promove permeabilidade vascular independente de VEGF e seu efeito envolve a fosforilação de eNOS (WELSH; WELSH, 2013).

A ativação sustentada da proliferação celular e a sobrevivência das células sem, contudo, desencadear a migração das mesmas produzirá estruturas vasculares caóticas com células endoteliais empilhadas e projetadas em direção ao lúmen. A migração das células endoteliais é regulada através de múltiplas vias, convergindo com frequência para a estimulação de PI3K que, por sua vez, induz a ativação da família Rho de proteínas G. A invasão das células endoteliais ocorre através da liberação de MMPs, as quais degradam a membrana basal e a matriz extracelular permitindo a migração das células e levando à formação de brotamentos capilares (WELSH; WELSH, 2013).

Determinados componentes inflamatórios também contribuem para a promoção da angiogênese através do desencadeamento de mecanismos de sinalização em células formadoras de vasos sanguíneos. Um exemplo é a ciclooxigenase, uma enzima que catalisa a conversão do ácido araquidônico em prostaglandina. A isoforma 1 (COX-1) é expressa em todos os tecidos e a isoforma 2 (COX-2) participa nas diferentes etapas da angiogênese tumoral. A prostaglandina E₂ (PGE₂) derivada da conversão pela COX-2 pode estimular fatores pró-angiogênicos, além de exercer também uma ação parácrina sobre as células vasculares (WANG; DUBOIS, 2004; CLEMENTE et al., 2013).

Figura 12 - Vias de sinalização que promovem a angiogênese



Fonte: Disponível em: <http://www.cellsignal.com/pathways/angiogenesis.jsp> Acesso em: 16 setembro 2012. Figura adaptada contendo os mecanismos envolvidos na angiogênese bem como as proteínas envolvidas na cascata de sinalização. As proteínas no final da via de sinalização são as mais investigadas no estudo da ação antiangiogênica da própolis. Ex.: ERK, MAPK, Akt, PKC.

As investigações enfocando as cascatas de sinalização envolvidas na ação antiangiogênica da própolis são recentes, havendo diversas hipóteses quanto à ação desempenhada nas células endoteliais.

Em 2008, Ohta et al. sugeriram que o mecanismo provável de supressão da angiogênese pela própolis se daria através da indução de apoptose. No mesmo ano, essa hipótese foi comprovada por Motomura et al. (2008) que demonstraram que a própolis modulou negativamente os níveis da proteína antiapoptótica Bcl-2, estimulou a ativação da caspase-3, sem contudo influenciar a proteína Bax, uma proteína pró-apoptótica. Entretanto, em uma revisão de Sawicka et al. (2012) há evidências de que a própolis induz vias apoptóticas, em linhagens

tumorais, pela ativação das proteínas Bax, p53, p21, p38 e das proteínas quinases MAPK, JNK e ERK. Em contrapartida, o estudo de Xuan et al., (2010) utilizando a própolis chinesa, demonstrou em tratamentos com concentrações de 6,25; 12,5 e 25 µg/ml, durante 6 e 12 horas de exposição, diminuição significativa da atividade e dos níveis da enzima fosfolipase C específica para fosfatidilcolina (PC-PLC) assim como dos níveis de p53.

Kunimasa et al. (2009) demonstraram que mudanças nos sinais de sobrevivência (ERK1/2) estão diretamente envolvidas no efeito antiangiogênico da própolis. A detecção, através de *western blotting*, revelou que a própolis suprimiu a fosforilação de ERK1/2, mas não da Akt. A inibição farmacológica através do uso de um inibidor específico de ERK1/2, U0126, demonstrou que essa inativação é suficiente para bloquear a tubulogênese e induzir a apoptose. O tratamento com quercetina (40 µM), reduziu a fosforilação da Akt nas HUVECs, mantendo, contudo, a quantidade total dessa proteína, inalterada (PRATHEESHKUMAR et al., 2012).

Chikaraishi et al. (2010) mostraram que a própolis verde brasileira e seus constituintes (derivados do ácido cafeoilquínico), suprimiram a fosforilação de ERK e p38 induzida por VEGF, em HUVEC. Os autores sugerem que o efeito angiostático seria dependente da inibição da via MAPK estimulada pelo VEGF.

As MAPKs transduzem sinais envolvidos em diversas vias celulares e funções em resposta a uma variedade de ligantes e estímulos celulares. Funções inapropriadas das MAPKs têm sido identificadas em condições como câncer e doenças como obesidade e diabetes. Em

muitos tipos celulares, MAPKs e ERK1/2 estão relacionadas a alterações no mecanismo de proliferação celular (LAWRENCE et al., 2008).

A própolis também induziu a apoptose por meio da ativação da vias das caspases. Em especial, a caspase-3, foi ativada após o tratamento com extrato de própolis (MOTOMURA et al., 2008; KUNIMASA et al., 2009; SAWICKA et al., 2012). Orsolíc e Basic (2003) avaliaram a ação de extratos de própolis provenientes da Croácia e Brasil sobre diferentes linhagens celulares. Na linhagem de carcinoma mamário (MCA) houve um aumento de 24% e 26% de células apoptóticas após exposição à própolis (50 µg/ml) brasileira e croata, respectivamente, em comparação ao controle. Na linhagem de células epiteliais de carcinoma humano (HeLa) o percentual de células apoptóticas foi de 10% nos grupos tratados com a própolis croata e de 9,5% nos tratamentos com a própolis brasileira (comparado aos 2% do controle). Porém, o percentual de células apoptóticas na linhagem não-neoplásica de fibroblastos de pulmão de hamster chinês (V79), expostas a ambos os extratos de própolis (da Croácia e Brasil), foi menor do que as células não-tratadas. Esses resultados são de grande importância, pois evidenciam diferentes graus de sensibilidade à própolis entre células cancerosas e fibroblastos normais e uma seletividade da própolis sobre as células tumorais.

Embora a apoptose seja a forma mais rápida de morte celular, processos de necrose e morte autofágica, por exemplo, podem ocorrer em um mesmo tecido. Morfologicamente, a morte celular por necrose refere-se a um aumento do volume celular, intumescimento de organelas

com consequente ruptura da membrana plasmática e extravasamento do conteúdo intracelular. O termo necrose origina-se da palavra grega "nekros" a qual é traduzida como "corpo morto". A necrose é uma morte celular que independe de caspases. Da mesma forma que a apoptose, a necrose pode ser considerada também uma forma de execução de morte celular programada, embora as consequências da morte celular por necrose e apoptose sejam bastante diferentes. Em se tratando de necrose, uma resposta inflamatória pode ser causada pelo extravasamento de componentes citosólicos no espaço intercelular através da membrana plasmática danificada. Na apoptose, esses produtos são isolados no interior de macrófagos. Um terceiro tipo de morte celular é a morte autofágica. Autofagia é uma via de degradação altamente conservada dos componentes celulares, a qual inclui a macroautofagia, a microautofagia e a autofagia mediada por chaperonas. A macroautofagia é a mais conhecida uma vez que envolve a formação de autofagossomas de dupla membrana que englobam organelas danificadas ou indesejadas e disponibiliza-os aos lisossomos para degradação e reciclagem (CHAABANE et al., 2013).

Berghe et al. (2010) relatam que, além da morte celular por necrose, existem ainda outras duas variações desse tipo de morte muito similares à necrose: a necroptose e a necrose secundária. Contudo, esses três tipos de morte por necrose (necroptose, necrose e necrose secundária) são caracterizadas por uma mesma sequência de eventos subcelulares, como a permeabilização da membrana lisossomal, explosão oxidativa mitocondrial e permeabilização da membrana plasmática. Portanto, o termo "necroptose" refere-se à morte por necrose

programada, pois há evidências de que a morte por necrose é algumas vezes também controlada e programada. Isso ocorre quando uma célula, por algum motivo (por exemplo, baixo nível de ATP) não é capaz de morrer por apoptose (CHAABANE et al., 2013). A necrose secundária é o processo que ocorre quando as células fagocitárias não realizam a remoção de corpos apoptóticos, resultando em necrose autolítica. De fato, no ambiente *in vitro* ocorre necrose secundária no final de todo o processo apoptótico, pois nessas condições as células fagocitárias estão ausentes (WYLLIE; KERR; CURRIE, 1980).

1.4.4 Própolis

É uma das substâncias compostas mais fascinantes fabricadas pelas abelhas, tanto pelo fato de ser cuidadosamente elaborada, quanto por constituir um material de defesa (BANKOVA, 2009). O termo própolis é derivado do grego *pro-*, em defesa e *polis-*, cidade ou comunidade, isto é, em “*defesa da comunidade*”. De fato, as abelhas utilizam esse produto na defesa da sua colmeia, através do fechamento de orifícios e frestas para impedir a invasão de insetos e microorganismos. Elas utilizam a própolis também para revestir internamente a entrada da colmeia e recobrir as carcaças dos animais invasores que foram mortos, desta forma isolando-os e protegendo a colmeia da disseminação bacteriana. Adicionalmente, utilizam a própolis para o preparo de locais assépticos à postura da abelha rainha. A própolis também contribui na manutenção da temperatura interna da colmeia em

torno de 35° C (MARCUCCI, 1996; MARCUCCI et al., 2001; SALATINO et al., 2005).

A própolis é uma complexa mistura de substâncias, elaborada pelas abelhas e que sofre adição de secreções salivares e enzimas, sendo considerada, portanto, um opoterápico pela ANVISA (Resolução Normativa nº 10 de 6 de dezembro de 1978, publicada no DOU de 15/02/79. Acesso em: 03 agosto 2013). Essa complexa mistura contém ainda material resinoso coletado de ramos, flores, brotos e exsudatos da flora local (Figura 13; PEREIRA et al., 2002). Por esta razão, a composição química variável da própolis depende também da biodiversidade de cada região visitada pelas abelhas (CASTRO et al., 2007). É importante destacar que tanto as abelhas nativas (abelhas sem ferrão) quanto as abelhas africanizadas *Apis mellifera* L., são responsáveis pela produção da própolis (SAWAYA; CUNHA; MARCUCCI, 2011).

As abelhas africanas (*Apis mellifera scutellata*) sabidamente conhecidas como altamente produtivas e agressivas, foram introduzidas no Brasil em 1956 em Camaquã na região de Rio Claro-SP com o intuito de se executar um programa de melhoramento genético que fosse capaz de aumentar a produção de mel no país, associado a uma baixa agressividade. Entretanto, devido a um acidente inadvertido no apiário onde as rainhas africanas estavam sob quarentena, ocorreu a enxameação de 26 colmeias. Isso levou ao início de um processo de cruzamento natural com abelhas de origem europeia (*Apis mellifera mellifera*, *Apis mellifera ligustica*, *Apis mellifera carnica*, *Apis mellifera caucasica*) que haviam sido trazidas pelos imigrantes entre 1840-1850,

propiciando a formação de um híbrido, que foi chamado de abelha africanizada (SOARES, 2012).

Figura 13 - Coleta de exsudato resinoso pela abelha



Fonte: Dausch et al., (2007, p. 436). Foto ilustrando a coleta de exsudato pela abelha a partir de fontes vegetais.

A própolis é um dos produtos naturais que vêm sendo utilizados durante séculos pela humanidade. Seu uso pela medicina popular data de 300 a.C. pelos povos assírios, gregos, romanos, incas e egípcios, por exemplo (LUSTOSA et al., 2008). Hipócrates (460-377 a.C.), que é considerado o pai da medicina moderna, prescreveu o uso da própolis para ajudar a curar feridas e úlceras internas e externas. Esse foi o primeiro registro do uso da própolis como medicamento (BANKOVA, 2009). As farmacopeias de Londres, no século 17, listavam a própolis como droga oficial (SFORCIN; BANKOVA, 2011). Contudo, essa indicação não existe atualmente na farmacopeia britânica (The British Pharmacopoeia 2013. Disponível em:

<http://www.pharmacopoeia.co.uk/2013/about.htm>. Acesso em: 03 agosto 2013).

Nas últimas décadas, a própolis ganhou ampla aceitação na medicina popular em várias partes do mundo. Tal popularidade tem estimulado seu uso comercial em alimentos e bebidas, bem como produtos de uso diário, como sabonetes e cremes dentais. O interesse generalizado na própolis, em muitos países, tem encorajado uma grande quantidade de pesquisas em química e atividades biológicas daquela biomassa (SALATINO et al., 2011).

A primeira divulgação científica a respeito da composição química da própolis ocorreu em 1908 indexado no *Chemical Abstracts*. Em 1968, surgiu no *Chemical Abstracts* o resumo da primeira patente utilizando a própolis (Romena, para a produção de loções para banho). No Brasil, o interesse pela própolis aconteceu somente na década de 80 com o trabalho pioneiro de Ernesto Ulrich Breyer, demonstrando em seu livro "Abelhas e saúde", as propriedades terapêuticas da própolis e sua utilização como antibiótico natural (LUSTOSA et al, 2008).

Análises químicas apontam para a presença de pelo menos 300 compostos químicos em sua composição, criando, assim, um problema para o seu uso como medicação e também à sua padronização (MARCUCCI, 1995; BANKOVA et al., 2000). Uma das causas da variabilidade da composição da própolis é a redução da disponibilidade das principais fontes de resina, durante as mudanças sazonais, quando outros materiais começam a ser coletados (SALATINO et al., 2011). Outro fator que dificulta a padronização é a existência de diferentes solventes utilizados para a extração, e.g., etanol, metanol e água, os

quais podem gerar extratos de composição química diversa e influenciar a atividade biológica de interesse (SFORCIN; BANKOVA, 2011).

Devido a essa alta variabilidade na sua composição, houve, na virada do século XXI, uma mudança de paradigma na investigação da própolis. Percebeu-se que não há um único produto que contém "apenas própolis". Isto resultou em uma nova abordagem à investigação das atividades biológicas daquela matriz complexa, porque se entendeu que não é suficiente relatar que experimentos foram realizados com própolis, mas que é necessário caracterizá-la quimicamente também (BANKOVA, 2009).

Para a produção de própolis, as abelhas podem coletar materiais resinosos de uma variedade de fontes botânicas provenientes de diferentes partes das plantas. São substâncias ativamente secretadas pelas plantas, tais como exsudatos lipofílicos das folhas, látex e resinas (CASTALDO; CAPASSO, 2002), introduzidas durante a sua elaboração, com variações tanto geográficas como sazonais significativas (MARCUCCI, 1995; LUSTOSA et al., 2008).

Em alguns casos, as abelhas também cortam fragmentos de tecidos vegetais para liberar as substâncias necessárias à produção da própolis (BANKOVA, 2009). A coloração da própolis também pode variar de acordo com a sua procedência, expressando padrões de cor que variam do marrom escuro a uma tonalidade esverdeada até o marrom avermelhado, sendo que tais colorações podem ser utilizadas à caracterização da própolis. De forma similar, a própolis possui odor aromático característico, que pode variar entre amostras, bem como, sabor resinoso (MARCUCCI, 1996; SALATINO et al., 2011).

A própolis contém ceras, resinas, compostos voláteis e quantidades menores de outras substâncias. A cera da própolis é um produto das glândulas das abelhas, com uma composição similar a cera de abelhas com prevalência de hidrocarbonetos e ésteres de ácidos graxos e alcoóis de cadeia primária longa (SALATINO et al., 2011). Nessa complexa matriz química, é possível encontrar compostos fenólicos e ésteres, flavonóides (ex.: flavonas, flavonóis, dihidroflavonóides e chalconas), terpenos, beta-esteróides, aldeídos aromáticos, sesquiterpenos e estilbeno terpenos (MARTOS et al., 2008). Sua composição varia em função de diversos fatores, tais como, a fonte dos exsudatos, o clima e as demais condições ambientais (MARCUCCI, 1995; BANSKOTA et al., 2001; PEREIRA et al., 2002). Alguns componentes químicos estão presentes em todas as amostras de própolis, enquanto outros ocorrem somente em própolis derivadas de espécies particulares de plantas (VARGAS et al., 2004). Entretanto, é importante lembrar que embora a composição química da própolis seja um dado extremamente importante, suas distintas atividades farmacológicas podem decorrer do sinergismo entre os seus diversos componentes químicos (KROL et al., 1993).

No Brasil, foram descritas distintas propriedades biológicas e composição química para amostras de própolis coletadas em diversas regiões do país (PARK; ALENCAR; AGUIAR, 2002; DAUGSCH et al., 2007; SILVA et al., 2007). Essa variação em atividades biológicas é facilmente explicada pela grande biodiversidade brasileira, a qual confere uma grande heterogeneidade química à própolis (PEREIRA et al., 2002). De acordo com Hendi, Naher e Al-Charrakh (2011), o Brasil

produz uma das melhores própolis do mundo devido ao seu clima tropical e subtropical e à diversidade de espécies fontes de resinas em suas florestas.

As amostras tropicais de própolis, especialmente as brasileiras, têm mostrado diferenças significativas nas suas composições químicas em relação à própolis da zona temperada. Por essa razão, a própolis brasileira têm se tornado objeto de interesse por parte dos cientistas (LUSTOSA et al., 2008). Não somente os pesquisadores, mas também os países importadores de própolis, como o Japão, demonstram grande interesse pela própolis brasileira (SALATINO et al., 2005). Em 2002, o Brasil produzia de 10 a 15% da produção mundial de própolis e atendia a cerca de 80% da demanda japonesa (PEREIRA et al., 2002). O interesse dos japoneses é traduzido no número de publicações envolvendo a própolis brasileira (KUNIMASA et al., 2009; CHIKARAISHI et al., 2010; SHIMIZU et al., 2011; KAKINO et al., 2012; OKAMOTO et al., 2013).

No ano 2000, amostras de própolis brasileira coletadas nas regiões Sul, Nordeste e Sudeste, foram quimicamente caracterizadas e classificadas em 12 tipos - grupo 1 ao 12 - com variação em cor e no percentual de substâncias solúveis, além de ter sua atividade antimicrobiana e antiinflamatória testadas (PARK; IKEGAKI; ALENCAR, 2000). Posteriormente, foi encontrado um tipo peculiar de própolis ao longo do litoral e costas dos rios no nordeste brasileiro, a qual foi designada própolis do grupo 13 (própolis vermelha), também apresentando atividade antimicrobiana (DAUGSCH et al., 2007). De acordo com Salatino et al., (2005), esse estudo de Park, Ikegaki e Alecar

(2000) é um indicativo de que a afirmação apenas de que determinada amostra corresponde a "própolis brasileira" dificilmente revela algum indicativo de características físicas, químicas e biológicas, pois uma grande diversidade de tipos de própolis existe em um país tão extenso geograficamente como o Brasil, o qual abriga uma grande diversidade de plantas e possui complexa variação genética de abelhas.

Amostras de própolis coletadas no Brasil já têm sido investigadas em um grande número de ações biológicas (MARCUCCI, 1995; BANSKOTA et al., 2000; MARQUELE et al., 2005; SFORCIN, 2007; DAUGSCH et al., 2007). Vale destacar que a própolis coletada no Estado de Minas Gerais tem sido extensivamente investigada em estudos que incluem modelos de angiogênese (AHN et al., 2007; KUNIMASA et al., 2009; MOURA et al., 2009; CHIKARAISHI et al., 2010; DALEPRANE et al., 2012). A própolis suprarreferida é constituída principalmente de derivados prenilados de ácido *p*-cumárico (LUSTOSA et al., 2008). De outra forma, a própolis produzida no Estado de Alagoas apresentou conteúdos elevados dos isoflavonóides medicarpina e 3-hidróxi-8,9-dimetoxi pterocarpano (SILVA et al., 2007). Recentemente, a própolis de Sergipe mostrou importante atividade antioxidante e antitumoral e revelou, na sua composição, elevadas concentrações de ácidos fenólicos e flavonóides, tais como formononetina, isoliquiritigenina, liquiritigenina, medicarpina e biochanina A (FROZZA et al., 2013). Outro tipo de própolis, coletada na região Norte (Estado do Amazonas), evidenciou altos conteúdos de benzofenonas polipreniladas (ISHIDA et al., 2011).

No Brasil, o tipo de própolis mais comercializada é conhecida como própolis verde tem como fonte de resina a *Baccharis dracunculofia* (planta conhecida popularmente como alecrim do campo, nativa do cerrado brasileiro), contendo predominantemente fenilpropanóides prenilados (ex.: artepilina C), ácidos clorogênico e benzoico e triterpenóides, obtida na região Sudeste (SALATINO et al., 2005). Por sua vez, a própolis vermelha (obtida na região Nordeste) tem sido quimicamente caracterizada, evidenciando a presença de pterocarpanos, isoflavonóides, chalconas e fenilpropanóides (ALENCAR et al., 2007).

Em um estudo realizado por Machado et al., (2012), utilizando um *pool* de diversas amostras de própolis provenientes de Minas Gerais, São Paulo, Rio Grande do Sul, Paraná e, inclusive, de Santa Catarina (os extratos de origens diversas foram misturados em concentrações padronizadas), no qual predominou a própolis verde, foram identificados os seguintes constituintes: ácido cafeoilquínico e derivados prenilados do ácido cinâmico, tais como artepilina C e bacarina. Foram evidenciadas, a partir dessa própolis verde, atividades antiinflamatória e imunomoduladora.

É digno de nota a abundância de propriedades biológicas e farmacológicas que a própolis representa. Dentre elas, pode-se citar ainda as atividades antibacteriana (SAHINLER; KAFTANOGLU, 2005; ISHIDA et al., 2011), antiviral (SHIMIZU et al., 2011), antifúngica (DOTA et al., 2010). Além disso, uma diversidade de estudos prévios têm relatado ações biológicas da própolis e compostos relacionados, sobre os vasos sanguíneos, especialmente com respeito à atividade

antiangiogênica (HEPSEN et al., 1999; SONG et al., 2002; AHN et al., 2007; OHTA et al., 2008; KESHAVARZ et al., 2009; KUNIMASA et al., 2009; MESSERLI et al., 2009; MOURA et al., 2009; BASINI et al., 2010; CHIKARAISHI et al., 2010; DALEPRANE et al., 2012).

Uma das técnicas mais frequentemente utilizadas à análise e determinação dos constituintes químicos da própolis é a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detectores espectrofotométricos (UV-visível, arranjo de diodos, e.g.) de massas. Através do uso desse método, a composição química de amostras de própolis brasileira tem sido relatada (PARK; ALENCAR; AGUIAR, 2002; DAUGSCH et al., 2007; SILVA et al., 2007; SOUZA et al., 2007). Porém, no momento, assume-se como incipiente o que se conhece a respeito do perfil químico e das atividades biológicas correlatas da própolis produzida no Estado de Santa Catarina.

1.4.5 Modelos de estudo da angiogênese

Modelos *in vitro* com linhagens de células endoteliais isoladas têm permitido que se estudem diversos aspectos do processo angiogênico como a migração endotelial, a proliferação, a digestão proteolítica da matriz extracelular e a capacidade das células realizarem tubulogênese (CIMPEAN et al., 2010). As linhagens celulares comumente utilizadas nas investigações *in vitro* são: HUVEC, BAEC (célula endotelial da aorta bovina), HDMEC (célula endotelial da microvasculatura da derme humana), HMEC-1 (células endoteliais microvasculares humanas), HUAEC (células endoteliais de artéria

umbilical humana), dentre outras. No entanto, a HUVEC ainda representa o tipo de célula vascular humana mais simples e disponível sendo amplamente utilizada na pesquisa biomédica (SIOW, 2012). Além disso, no campo da angiogênese, as respostas obtidas nos ensaios *in vitro* devem ser confirmadas em ensaios *in vivo* (NORRBY, 2006).

Ensaio mais complexos envolvem metodologias *ex vivo* onde um pedaço de tecido, geralmente uma secção anelar de artéria ou veia (aorta ou veia cava), é cultivada em uma matriz tridimensional, tal como colágeno tipo I e a quantificação de microvasos é feita a partir dela. De acordo com Hernandez-Fernaud et al. (2013), esse tipo de ensaio representa um modelo mais próximo da angiogênese fisiológica porque incluem diferentes tipos celulares que participam da formação de novos vasos.

Dentre os modelos *in vivo* empregados para o estudo da angiogênese tem-se: o ensaio da membrana corioalantóica (MCA) de embriões de *Gallus domesticus*, método utilizado para avaliar angiogênese (JAKOB et al., 1978; McCORMICK et al., 1984; VU et al., 1985; PEEK et al., 1988; NGUYEN; SHING; FOLKMAN, 1994), assim como o ensaio da membrana vitelínica (MVA) voltada também ao estudo da vasculogênese (CHAPMAN et al., 2001; DIAS et al., 2008a), a neovascularização da córnea de coelhos (HEPSEN et al., 1999), o implante subcutâneo de Gelfoam® (esponja de gelatina estéril) em ratos e camundongos (DIAS et al., 2005; MOURA et al., 2009), modelo de plug de Matrigel® (NORRBY, 2006), o modelo de angiogênese do Zebrafish (NICOLI; PRESTA, 2007; TOBIA et al., 2013), o modelo de retinopatia induzida por oxigênio em roedores (CHIKARAISHI et al.,

2010) e o modelo do saco aéreo subcutâneo no dorso de camundongos inoculados com células tumorais (AHN et al., 2007). Porém, dentre todos esses modelos, existe um ensaio ideal para investigar a angiogênese *in vivo*?

Segundo Norrby (2006), a heterogeneidade dos tecidos e a complexidade celular e molecular das reações angiogênicas fazem com que ainda não se tenha descrito um ensaio ideal. Na verdade, um bom ensaio deve ser confiável, reproduzível e contar com uma metodologia rigorosa para se medir a angiogênese. Todos os ensaios para se medir a angiogênese, acima citados, possuem vantagens e desvantagens, não existindo, portanto, até o momento, um ensaio ideal. As vantagens do ensaio da MCA consiste em ser uma técnica simples, possuir baixo custo, adequado para um *screening* em grande escala e permitir uma observação não-invasiva. Contudo, este ensaio clássico também apresenta certas desvantagens como, por exemplo, a difícil visualização dos novos microvasos.

Talvez o aspecto de maior importância em relação a essa diversidade de ensaios disponíveis para o estudo da angiogênese, *in vivo*, esteja, justamente, nas especificidades e peculiaridades de cada um, no que concerne ao tipo de resposta angiogênica. E, por esse motivo, os resultados obtidos com um tipo de ensaio não deveriam ser generalizados mas, sempre que possível, repetidos (e confirmados) em outros tipos de ensaios, referidos separadamente.

1.4.6 Hipóteses do trabalho

1.4.6.1 Primeira hipótese

O extrato hidroalcoólico de própolis outonal catarinense apresenta atividade antiangiogênica *in vivo* e *in vitro*, através da regulação dos mecanismos que controlam o crescimento vascular como a proliferação, a migração e a tubulogênese.

1.4.6.2 Segunda hipótese

O extrato hidroalcoólico de própolis outonal catarinense modula a sinalização dos mecanismos angiogênicos pelo bloqueio de proteínas como PKC, COX e MMP.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo central deste estudo é demonstrar as ações biológicas do extrato hidroalcoólico de própolis outonal catarinense, quimicamente caracterizado, em eventos relacionados a processos de formação de vasos sanguíneos, utilizando modelos de estudo *in vitro* e *in vivo*, e propor possíveis mecanismos de ação envolvidos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar a composição química do extrato hidroalcoólico de uma amostra de própolis outonal catarinense.
- Investigar a viabilidade de células da linhagem HUVEC expostas a três amostras de extrato hidroalcoólico de própolis (outono, primavera e inverno) por meio do ensaio de citotoxicidade do MTT.
- Analisar, *in vitro*, o efeito de concentrações de extrato hidroalcoólico de própolis outonal na atividade proliferativa de HUVEC pelo ensaio de incorporação pelo BrdU.
- Avaliar, *in vitro*, a ação do extrato hidroalcoólico de própolis outonal na migração unidirecional de HUVEC utilizando o ensaio de formação de cicatriz em monocamada celular (*wound-healing assay*).
- Examinar, *in vitro*, as possíveis influências de concentrações crescentes de própolis outonal na tubulogênese de

HUVEC sobre um substrato rico em proteínas da matriz extracelular (Matrigel®).

- Determinar os possíveis processos de morte celular desencadeados pela própolis.

- Examinar se as enzimas PKC e COX, importantes na proliferação celular endotelial, estão envolvidas na modulação vascular da própolis.

- Averiguar qual o efeito do extrato hidroalcoólico da própolis na atividade da MMP-9 aplicando o método de zimografia.

- Investigar a ação de um composto puro majoritariamente presente no extrato de própolis em estudo, no mecanismo de proliferação celular.

- Verificar, *in vivo*, se o extrato hidroalcoólico de própolis outonal atua na formação de vasos primordiais (vasculogênese) na MVA de embriões de *Gallus domesticus*.

- Determinar, *in vivo*, os efeitos do extrato hidroalcoólico de própolis outonal na formação de microvasos a partir de vasos pré-existentes (angiogênese) na MCA de embriões de *G. domesticus*.

3 METODOLOGIA

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Obtenção do extrato de própolis

O Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal - LMBV (Núcleo de Produtos Naturais/CCA/UFSC), em parceria com a FAASC (Federação dos Apicultores e Meliponicultores de Santa Catarina) recebeu as amostras de própolis bruta coletadas nos apiários de apicultores selecionados, nas estações de outono, primavera e inverno de 2010. A Epagri (Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina) participou como parceira e apoiadora, sendo responsável pela logística das coletas e remessa da própolis dos apiários à UFSC.

No LMBV, o preparo dos extratos hidroalcoólicos de própolis consistiu da adição de 12,5 ml de solução hidroalcoólica [70% de etanol (p.a.), 30% de água ultra-pura (v/v)] a 2 g de própolis, seguindo de incubação (70° C/30 min), sob agitação. O extrato foi centrifugado (5000 rpm/5min), coletando-se o sobrenadante para os ensaios biológicos, no LEBIMA.

As amostras de própolis coletadas no outono e primavera são provenientes da cidade de São Joaquim (latitude 28° 17' 38" Sul, longitude 49° 55' 54" Oeste) e a amostra coletada no inverno é proveniente da cidade de Urupema (latitude 27°57'20.96" Sul, longitude 49°52'34.59" Oeste), ambas localidades da região serrana do Estado. A flora típica da região é caracterizada pela floresta de Araucária, i.e.,

pinheiro do Paraná (*Araucaria angustifolia*), o qual produz um exsudato resinoso, que pode vir a ser coletado pelas abelhas à produção da própolis. Contudo, não se deve descartar exsudatos de outras plantas da região no planalto catarinense que podem vir a ser coletadas pelas abelhas para a produção da própolis.

3.1.2 Características organolépticas e químicas do extrato

Os extratos hidroalcoólicos das amostras coletadas nas regiões produtoras do Estado catarinense, foram submetidas inicialmente à espectrofotometria de UV-visível. Com base nessas análises, uma amostra de cada período sazonal, apresentando conteúdos mais pronunciados de ácidos fenólicos e flavonóides totais, foi selecionada para os ensaios biológicos. As concentrações de flavonas e flavonóis, flavononas e di-hidroflavonóis e ácidos fenólicos totais das amostras de própolis de outono, primavera e inverno, selecionadas para o *screening* inicial são mostradas na Tabela 1.

Tabela 1 - Concentração de flavonóides e ácidos fenólicos totais de extratos hidroalcoólicos de própolis outonal/2010.

PRÓPOLIS OUTONO	
Compostos	Concentração(µg/ml)
Flavonas e flavonóis ¹	395,5
Flavononas e di-hidroflavonóis ²	95,0
Fenólicos totais ³	873,3
PRÓPOLIS PRIMAVERA	
Compostos	Concentração(µg/ml)
Flavonas e flavonóis ¹	499,4
Flavononas e di-hidroflavonóis ²	1946,3
Fenólicos totais ³	1834
PRÓPOLIS INVERNO	
Compostos	Concentração(µg/ml)
Flavonas e flavonóis ¹	487,7
Flavononas e di-hidroflavonóis ²	1392,6
Fenólicos totais ³	1199,1

Fonte: Maraschin et al., (*Manuscrito em elaboração*). ¹ Expresso como equivalente quercetina, ² expresso como equivalente pinocembrina e ³ expressos como equivalente ácido gálico. Valores obtidos por espectrofotometria de UV-visível de três amostras de própolis provenientes de distintos períodos sazonais.

Alguns parâmetros químicos, tais como ácidos fenólicos e flavonóides totais, são importantes à caracterização de amostras de própolis. Os achados revelaram conteúdos elevados de flavonóides e ácidos fenólicos no extrato de própolis sob estudo, diferindo dos conteúdos descritos na literatura para amostras provenientes da Europa,

EUA, África, China e de outras regiões da América do Sul (Argentina e Uruguai; BANKOVA, 2009; KUMAZAWA et al., 2004; KOSALEC et al., 2004).

As três amostras de extrato de própolis provenientes de cada estação (primavera, outono e inverno) foram inicialmente testadas quanto ao seu efeito sobre a viabilidade celular pelo método colorimétrico do MTT, sendo que, após esse *screening* inicial, a amostra de outono (São Joaquim/SC) foi a escolhida para todos os ensaios subsequentes em função de sua ação na viabilidade das HUVECs.

Para além da caracterização química daquela matriz complexa acima descrita, técnicas mais refinadas como a cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (CLAE-FR) e ressonância magnética nuclear uni- e bidimensional (1D- e 2D-RMN) têm sido empregadas à identificação de constituintes químicos de composições complexas, tais como a própolis.

Por conseguinte, a amostra de outono foi analisada por CLAE-FR, revelando a predominância do flavonóide quercetina e de alguns ácidos fenólicos, tais como o ácido gálico, o ácido protocatecuico, ácido clorogênico e seus ésteres derivados como o ácido isoclorogênico A (3,5-ácido di-cafeoilquínico - CAS nº 2450-53-5) e ácido isoclorogênico C (4,5- ácido di-cafeoilquínico - CAS nº 32451-88-0) no extrato de própolis outonal (Tabela 2). Quantidades menores (<1,8 µg/ml) de ácido *p*-cumárico, ácido siríngico, ácido vanílico, ácido cafeico, ácido ferúlico e rutina também foram encontradas. O perfil químico caracterizado nessa amostra de própolis outonal catarinense é distinto de outras amostras de própolis brasileira, uma vez que flavonóides não são

compostos comumente identificados como majoritários na composição química.

Tabela 2 - Flavonóides e ácidos fenólicos identificados na própolis outonal/2010 catarinense pela técnica de CLAE-FR

Compostos	Concentração (µg/ml)
quercetina	144,24 µg/ml
ácido gálico	19,41 µg/ml
ácido protocatecuico	9,10 µg/ml
ácido clorogênico	6,59 µg/ml
ácido isoclorogênico A	4,70 µg/ml
ácido isoclorogênico C	3,20 µg/ml

Fonte: Maraschin et al., (*Manuscrito em elaboração*).

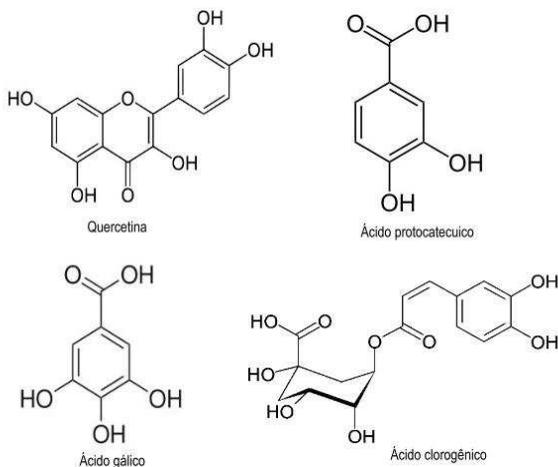
Essa amostra foi submetida posteriormente a análises de RMN, confirmando a presença de quercetina, ácido gálico, ácido protocatecuico e ácido clorogênico (Tabela 3, Figura 14). Estudos de espectrometria de massa com interfaces de ionização por electrospray, APCI (*atmospheric pressure chemical ionization*) e APPI (*atmospheric pressure photoionization*) encontram-se em andamento no Núcleo de Produtos Naturais (LMBV/UFSC) visando um maior detalhamento do perfil químico do extrato hidroalcoólico em estudo.

Tabela 3 - Deslocamentos químicos (^1H e ^{13}C - RMN, ppm) e multiplicidade de prótons atribuídos aos compostos fenólicos encontrados na própolis outonal.

Composto	$\delta_{\text{ppm}} \text{ } ^1\text{H}$ (multiplicidade)	$\delta_{\text{ppm}} \text{ } ^{13}\text{C}$
Quercetina	7.70 (d), 7.55 (dd), 6.90 (d), 6.41 (s), 6.19 (s)	114.78, 119.70, 115. 17, 93.10, 98.05
Ácido protocatecuico	7.40 (d), 7.35 (dd), 6.79 (d)	117.70, 123.39, 115.88
Ácido gálico	7.03 (s)	112.15
Ácido clorogênico	7.62 (d), 7.16 (d),	148.51, 118.01,
	7.08 (dd), 6.86 (d), 6.35 (d),	125.20, 118.96,
	5.30 (m), 4.23 (d), 3.86 (dd), 2.14 (m), 2.02 (m)	116.95, 73.09, 73.89, 75.60, 41.11

Fonte: Maraschin et al., (*Manuscrito em elaboração*). Com relação à referência de ressonância TSP $_{\delta\text{H}}$ 0.00 ppm. Valores de prótons de hidrogênio e carbono verificadas em bases de dados referentes aos compostos identificados.

Figura 14 - Estruturas químicas dos componentes da própolis confirmados por RMN



Fonte: <http://pt.wikipedia.org/wiki/> (Acesso em 14 out 2013).

Os compostos fenólicos representam uma grande variedade de substâncias caracterizadas pela presença de um ou mais anéis aromáticos, ligados a pelo menos um radical hidroxila e outros substituintes, e podem ser divididos de acordo com o número de anéis fenólicos e com as estruturas às quais estão ligados. Os grupos de compostos fenólicos mais abundantes nos alimentos são os flavonóides, os ácidos fenólicos e as lignanas (OLIVEIRA; BASTOS, 2011). Os flavonóides têm sua estrutura baseada no arranjo C6-C3-C6 (2-fenil-benzopirano), sendo representados por várias classes, de acordo com o grau de oxidação do anel central (SANTOS; BLATT, 1998).

No que diz respeito às características organolépticas do extrato de própolis utilizado em todos os ensaios, podemos afirmar que ele possui coloração marrom clara e odor balsâmico característico (Figura 15).

Figura 15 - Coloração da própolis outonal coletada no município de São Joaquim/SC



Fonte: Maraschin et al., (*Manuscrito em elaboração*).

É importante esclarecer que, segundo a Instrução Normativa nº 3 de 19 de janeiro de 2001 (Disponível em: <http://www.sfdk.com.br/imagens/lei/MA%20-%20Inst%20Norm%203.htm>. Acesso em: 08 fevereiro 2013), da Secretaria de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura e do Abastecimento, no que diz respeito ao regulamento técnico de identidade e qualidade do extrato de própolis, os referenciais exigidos para compostos fenólicos e flavonóides são, quantidades mínimas de 0,5% (m/m) e 0,25% (m/m), respectivamente. Todos os extratos em estudo apresentaram valores de compostos fenólicos e flavonóides acima do exigido (Tabela 4).

Tabela 4 - Percentuais (m/m) de compostos fenólicos e flavonóides nas amostras de própolis catarinense coletadas em 2010

Amostra	Fenólicos	Flavonas	Di-hidroflavonóis
Outono	4,3%	1,9%	4,7%
Primavera	9,1%	2,4%	9,7%
Inverno	5,9%	2,4%	6,9%

Fonte: Ministério da Agricultura e Abastecimento. Todas as amostras empregadas nesse estudo possuem padrões referenciais compatíveis com os exigidos referente a qualidade do extrato de própolis.

É importante salientar que, com o objetivo de evitar algum efeito tóxico do solvente (etanol) presente no extrato de própolis sobre as HUVECs, determinados procedimentos foram realizados objetivando-se evitar as possíveis influências negativas do solvente nos resultados. Para os ensaios *in vitro*, a solução de tratamento foi homogeneizada (utilizando um vórtex) e mantida no interior do fluxo laminar por tempo suficiente (15 minutos) para evaporar o etanol, antes de ser adicionada às culturas. Somente após a evaporação a solução foi aplicada aos poços das placas. A concentração mais elevada de etanol utilizada nos poços de placas de cultura foi de 1% (e.g., ao se preparar 1000 µl de solução contendo meio de cultura e 200 µg/ml de própolis, o volume de etanol empregado foi de 10 µl).

Nos ensaios *in vivo* de MVA e MCA, o suporte de metilcelulose (disco) adsorvido com a própolis foi mantido em câmara de fluxo laminar durante 1 hora para possibilitar a evaporação do etanol (e também para a solidificação da metilcelulose), antes de ser implantado sobre as membranas anexas do embrião (E2 ou E6).

3.1.3 Reagentes

Dimetilsulfóxido/DMSO (Vetec, Duque de Caxias, RJ, Brasil), soro bovino fetal/SBF, salina tamponada fosfatada/PBS, meio de cultura RPMI (Roswell Park Memorial Institute)-1640 (Gibco, Auckland, Nova Zelândia), anti-bromodeoxiuridina produzido em rato/MAB 3222, anti-mouse produzido em ovelha IgG conjugado com fluoresceína IgG/AP124F, Fator de Crescimento Vascular Endotelial/VEGF-A, soro normal de cabra (Chemicon, Billerica, MA, EUA), 4',6-diamidino-2-fenilindrol dicloridrato/DAPI, 5-bromo-2'-deoxiuridina/BrdU, brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5,-difeniltetrazólio/MTT, Prolong® Gold (Invitrogen, Grand Island, N.Y., EUA), Matrigel® (BD, Mountain View, CA, EUA), Kit Anexina V FITC (Cayman Chemical Company, Michigan, EUA), GF109203X (Tocris Cookson, Inc. Langford, Bristol, UK), quercetina, U0126, metilcelulose, phorbol-12,13-dibutyrate/PDBu e indometacina (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, EUA).

3.1.4 Células

Células endoteliais da linhagem HUVEC de origem fetal e venosa (provenientes do Banco de Células do Rio de Janeiro), de passagens baixas, foram utilizadas, mantidas em meio RPMI-1640 suplementado com 5% SBF, 1% de estreptomicina e penicilina (100 unidades/ml), 1% L-glutamina (200 mM), 4,5 g/L D-glicose e 1,5 g/L de bicarbonato de sódio. As células foram cultivadas em atmosfera

umidificada em estufa condicionadora a 37° C e com ambiente suplementado com 5% de CO₂.

3.1.5 Embriões

Ovos de galinha fertilizados doados pela empresa *Tyson Foods* (São José, SC) foram mantidos em um ambiente umidificado (33%) em uma incubadora de ovos a 37° C de forma a iniciar o desenvolvimento do embrião logo após a postura. Após 48 horas do início da incubação (E2), os ovos foram removidos da incubadora e uma abertura (10 mm de diâmetro) foi feita na casca em uma posição adjacente ao embrião (embriões não-viáveis foram descartados). Um volume de 3 a 5 ml de albúmen foi retirado com o auxílio de uma seringa. Em seguida, essa abertura foi coberta com fita isolante preta de modo a impedir a entrada de luz no interior do ovo. Os embriões retornaram à estufa para dar sequência aos ensaios.

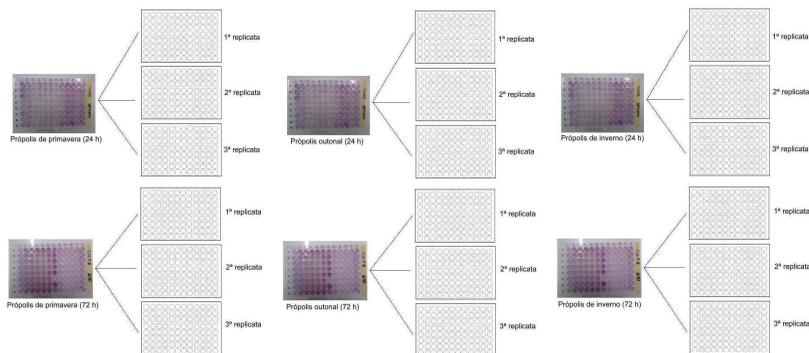
Todos os procedimentos para evitar estresse desnecessário aos embriões foram executados. O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina sob o número 00528 em 05 de novembro de 2010 (parecer em anexo).

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Ensaio de Viabilidade Celular

Este ensaio é um método colorimétrico com base no metabolismo do MTT. O ensaio foi realizado baseado no descrito por Mosmann, (1983). O MTT é um sal de coloração amarela que é acumulado pelas células por endocitose e a redução do anel tetrazólico deste sal pelas mitocôndrias de células vivas resulta na formação de cristais de formazan de cor violeta que se concentram em compartimentos endossomais e/ou lisossomais, sendo depois transportado para fora das células por exocitose. Sendo a endocitose um mecanismo fundamental das células vivas, o ensaio do MTT tem sido usado frequentemente como ensaio de viabilidade celular. Os cristais são solubilizados através do DMSO. HUVEC foram semeadas (15×10^3) em meio RPMI-1640 em placas de 96 cavidades (TPP, Suíça). Após 24 horas de incubação, as células foram tratadas com concentrações crescentes de própolis (3,12-3.200 $\mu\text{g/ml}$; 200 μl volume de solução por cavidade) de três amostras distintas (outono, primavera e inverno). Em diferentes placas o meio foi removido após 1 a 3 dias. Para um melhor entendimento observe o desenho experimental ilustrado na Figura 16.

Figura 16 - Desenho experimental do ensaio do MTT



Três experimentos independentes realizados com amostras de própolis coletadas em diferentes estações. Cada experimento foi realizado em tempos diferentes (24 e 72 h).

As cavidades foram cuidadosamente lavadas três vezes com PBS (100 μ l/cavidade) para remover eventual componente remanescente, antes da adição do MTT. Meio fresco foi adicionado à solução de MTT (5 mg/ml em PBS) em uma razão de 1:10. Após incubação em uma atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ em 37° C durante 3 horas, a solução foi trocada por 200 μ l de DMSO/cavidade, para dissolver o formazan e as placas sofreram agitação durante 5 minutos antes de irem para a leitora automática de microplacas (Thermo Plate®, Figura 17). A absorbância de 530 nm foi então determinada. Os resultados são expressos como percentual em relação ao controle e uma linearidade da relação entre concentração de própolis e o número de células viáveis foi examinada. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. O parâmetro usado para determinar a citotoxicidade foi CC₅₀.

Figura 17 - Placas de cultura após a dissolução do formazan



Fotos capturadas das placas de cultura após a dissolução do formazan para ilustrar a etapa final do ensaio de viabilidade celular.

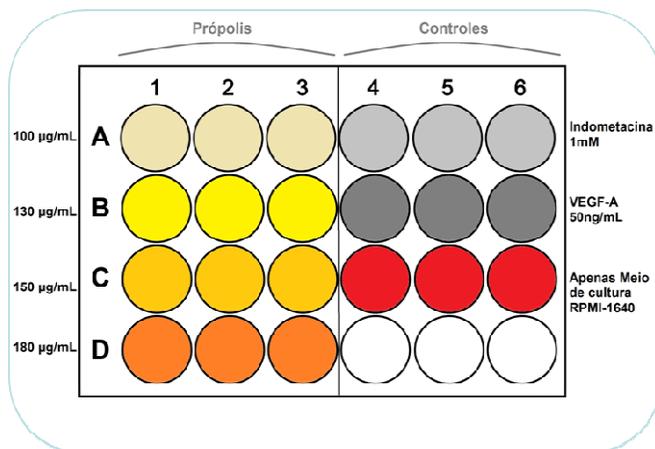
3.2.2 Ensaio de Proliferação Celular

O ensaio de proliferação celular foi adaptado de Lopes et al., (2009). Uma suspensão da linhagem HUVEC (20.000 células/cavidade) em meio RPMI-1640 contendo 5% de SBF foi adicionada em placas de 24 cavidades pré-revestidas com lamínulas circulares (Glasscyto®) previamente flambadas. No dia seguinte o meio foi substituído com ou sem própolis (100, 130, 150 e 180 $\mu\text{g/ml}$; 300 μl de volume por cavidade) e adicionado às cavidades sob condições estéreis. Cavidades contendo extrato de própolis nas concentrações de 150 e 180 $\mu\text{g/ml}$ foi coadministrado com 50 ng/ml de VEGF. Experimentos com grupos controle positivo e negativo (de ativação e inibição da angiogênese) foram realizados usando-se apenas VEGF (50 ng/ml) e indometacina (1 mM), respectivamente (Figura 18). As placas foram então incubadas por 72 horas. A incorporação com o marcador de DNA, BrdU, serve com

parâmetro de proliferação celular. Ele foi incorporado 3 horas antes da imunocitoquímica (1:100).

As células foram então fixadas com solução de paraformaldeído 4%, durante 30 minutos. Todas as etapas seguintes são intercaladas por três lavagens com duração de 5 minutos em PBS utilizando solução de Tween 20 0,25%. Após a lavagem, as células foram incubadas em HCl 2N a 37° C duas vezes de 15 minutos cada incubação. As próximas etapas foram realizadas sempre em temperatura ambiente.

Figura 18 - Desenho experimental da placa de cultura contendo os tratamentos



Desenho esquemático ilustrando todos os tratamentos realizados no ensaio de proliferação celular em células cultivadas sobre lamínulas circulares. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Em seguida, as células sofreram permeabilização com solução de Triton X-100 0,25 % durante 30 minutos. Após, sofreram a ação bloqueadora, durante 40 minutos, de uma solução contendo SBF 5% e

soro normal de cabra 0,5%. Em seguida, foram incubadas durante 2 horas com solução contendo anticorpo primário anti-BrdU (MAB 3222, Chemicon) diluído 1:200. Após a lavagem, as células foram incubadas por 1 hora na ausência de luz com anticorpo secundário anti-cabra conjugado Alexa Fluor 488 (FITC, AP124F, Chemicon) diluído 1:100. Subsequentemente, elas foram novamente lavadas e incubadas com DAPI (1:1000) durante 30 segundos.

As lamínulas contendo as células marcadas com BrdU e coradas com DAPI foram estendidas sobre lâminas histológicas usando Prolong Gold e examinadas com um microscópio de fluorescência (Olympus, BX41) em uma objetiva de 10X, equipado com um filtro para fluoresceína (Alexa Fluor 488, absorção: 494 nm emissão: 517 nm) e DAPI (absorção: 345 nm e emissão: 455 nm). Fotomicrografias digitais foram feitas de cinco campos aleatórios usando uma câmera acoplada ao microscópio (Q-imaging 3.3) através do software Q-capture Pro 5.1. Campos visuais então foram armazenados digitalmente e analisados através de contagem manual de núcleos marcados.

A proliferação celular endotelial foi avaliada através da quantificação da proporção de células que incorporaram o BrdU em cada condição experimental e os resultados expressos como média e \pm EPM de três experimentos independentes.

A indometacina, um agente anti-inflamatório não-esteroidal (AINE), foi utilizada como um controle negativo com sua concentração efetiva baseada no trabalho de Pearce et al., (2003), pois ela possui ação inibitória, não-seletiva, sobre a enzima cicloxigenase (COX) em suas isoformas 1 e 2. Cabe lembrar que a COX-1 possui função fisiológica

constitutiva e participa de uma série de processos de manutenção do organismo como a proteção da mucosa gástrica, homeostasia e regulação de perfusão renal. Em contrapartida a COX-2 está presente nos sítios de inflamação. A COX-2 regula a ativação de células endoteliais (disparo angiogênico) através do aumento da produção de VEGF (WANG; DUBOIS, 2004). De fato, a inibição da atividade dessas enzimas pela própolis já havia sido demonstrada (ROSSI et al., 2002).

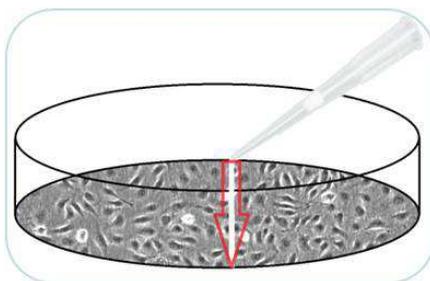
Na tentativa de confirmar a segunda hipótese do trabalho, ensaios adicionais foram realizados com o objetivo de verificar a ação do extrato de própolis na atividade enzimática da PKC no ensaio de proliferação celular. Para isso, grupos de tratamento com GF109203X (5 μ M; inibidor não-seletivo da PKC) e PDBu (100 nM; ativador não-seletivo da PKC) de forma isolada ou em associação com o extrato, foram realizados. Além disso, extrato de própolis (200 μ g/ml) também foi coadministrado com quercetina (40 μ M) e indometacina (1 mM).

3.2.3 Ensaio de Migração Celular

O ensaio *in vitro* de formação de cicatriz (*wound-healing assay*) foi realizado para mensurar a migração unidirecional das HUVEC baseando-se no trabalho de Izuta et al. (2009). Em resumo, as HUVEC (4 x 10⁴/cavidade) foram semeadas em placas de 24 cavidades e incubadas a 37° C até obter confluência. Nas monocamadas de HUVECs, foi confeccionada uma cicatriz em linha reta de aproximadamente 1 mm de espessura usando uma ponteira de pipeta de 10-200 μ l (Figura 19) e em seguida lavada três vezes com PBS.

Após as células foram incubadas com VEGF (50 ng/ml) e indometacina (1 mM) nas cavidades controle positivo e negativo, respectivamente. Nas cavidades contendo os tratamentos as concentrações utilizadas de extrato de própolis foram 100, 130, 150 e 180 $\mu\text{g/ml}$ durante 24 horas. Nenhuma coadministração foi realizada nesse ensaio.

Figura 19 - Confecção de cicatriz sobre a monocamada celular



Desenho esquemático ilustrando como foi realizado a confecção da cicatriz sobre uma monocamada confluyente de células endoteliais. A flecha indica a direção da ponteira.

Para mensurar o número de células endoteliais que migraram a partir da borda da cicatriz, imagens foram capturadas (magnificação de 25 X) imediatamente após a confecção da cicatriz e após 24 horas de incubação com os tratamentos, dos grupos tratados e respectivos controles, usando-se um microscópio de contraste de fase. A migração foi avaliada com base na contagem manual do número de células em migração dentro da região da cicatriz após o tratamento com o extrato de própolis outonal. Dados são expressos como média \pm EPM ($n=3$).

3.2.4 Ensaio de Tubulogênese

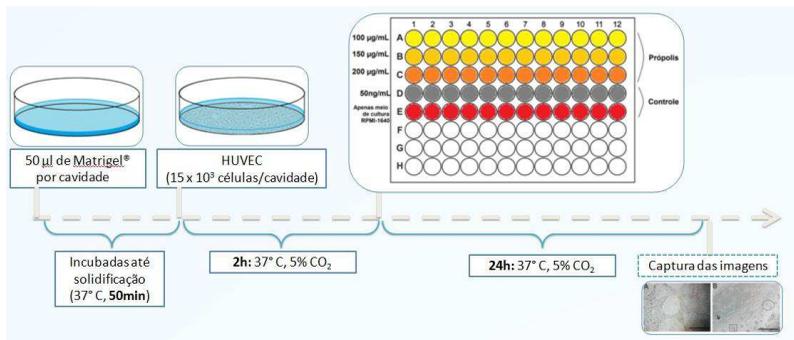
O ensaio de formação de estruturas semelhantes a tubos foi adaptado de Liao et al., (2003), para investigar o efeito do extrato de própolis outonal na angiogênese *in vitro*. Resumidamente, uma placa de 96 cavidades foi coberta com 50 µl de Matrigel® líquido (uma preparação de membrana basal constituída de proteínas da matriz extracelular extraída a partir do sarcoma de rato *Engelbreth-Holm-Swarm*), a qual foi colocada na estufa para solidificar a 37° C durante 50 minutos.

As células foram semeadas em uma densidade de 15×10^3 células por cavidade em 50 µl de meio de cultura completo e mantidas duas horas a 37° C. Decorrido este tempo, 150 µl de meio de cultura contendo diferentes concentrações de própolis (concentrações finais são 100, 150 e 200 µg/ml) e nos controles (VEGF ou apenas meio de cultura) foram adicionados (Figura 20). As placas foram incubadas a 37° C com umidade e ar atmosférico suplementado com 5% de CO₂, durante 24 horas, tempo suficiente para a formação de uma rede intacta no grupo controle (o qual foi exposto apenas ao meio de cultura).

A análise foi executada através da contagem das redes vasculares de tubos semelhantes a vasos usando um microscópio de luz invertido em uma magnificação de 25 X. As cavidades das placas de cultura foram fotografadas e o número de redes fechadas formadas por estruturas semelhantes a tubos, em cada cavidade, foi determinada (média de três diferentes campos contados em cada poço). Os dados foram expressos como o percentual do número de tubos nos grupos

tratados em relação ao controle. Dados representam a média \pm EPM (n=3).

Figura 20 - Esquema do ensaio de tubulogênese



Etapas sequenciais do ensaio de tubulogênese.

3.2.5 Ensaio de Morte Celular

Para investigar o tipo de morte celular desencadeada pelo extrato de própolis foi realizado o ensaio de morte celular através de citometria de fluxo. Através deste método, as células necróticas podem ser distinguidas das apoptóticas pela inclusão de marcadores fluorescentes, tais como a anexina-V e o iodeto de propídio (IP).

As HUVECs foram semeadas em placas de 24 cavidades na densidade de 5×10^5 células/ml, incubadas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO_2 e tratadas com concentrações crescentes (100, 130, 150 e 180 $\mu\text{g/ml}$) de extrato de própolis outonal. Foram realizados também tratamentos através da coadministração de extrato de própolis com VEGF (150 $\mu\text{g/ml}$ + VEGF e 180 $\mu\text{g/ml}$ + VEGF) e com U0126 (150

$\mu\text{g/ml}$ + U0126 e $180 \mu\text{g/ml}$ + U0126), além das administrações isoladas de VEGF (50 ng/ml) e U0126 ($5\mu\text{M}$, inibidor farmacológico de ERK1 e ERK2), durante 72 horas. Decorrido o tempo experimental, o sobrenadante foi coletado e as amostras foram rapidamente tripsinizadas para a remoção de células aderentes na placa de cultura. As frações coletadas de cada tratamento foram combinadas e centrifugadas. O kit de Anexina V FITC (Cayman Chemical Company, Michigan, EUA) foi utilizado para a detecção dos processos de morte celular relacionados ao cultivo de células endoteliais em exposição aos tratamentos acima citados.

As soluções referentes a cada amostra foram transferidas para tubos de citometria e 15 minutos antes da leitura pelo citômetro, $2 \mu\text{l}$ de anexina V-FITC foram adicionados em cada amostra. Decorrido esse tempo, $0,5 \mu\text{l}$ de IP também foi adicionado. Os tubos foram sempre mantidos ao abrigo da luz. A anexina V-FITC liga-se à fosfatidilserina que é translocada para a superfície da membrana plasmática no momento da apoptose e o IP marca danos na membrana plasmática de células necróticas.

Luz ultravioleta durante 20 minutos foi utilizada para estimular apoptose no tubo controle intitulado "anexina-V positivo" e o congelamento a -20°C por 20 minutos foi utilizado para estimular a morte por necrose celular no tubo controle intitulado "IP positivo".

O comportamento das células em função do tratamento com a própolis outonal foi analisado utilizando-se o citômetro de fluxo FACSCanto II apparatus (Becton Dickinson) no Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB) do Departamento de

Biologia Celular, Embriologia e Genética (BEG). Os resultados experimentais foram processados utilizando-se o software FlowJo 7.6.5 (Tree Star, Ashland, OR). A análise foi feita a partir de um *pool* de células em cada tratamento sendo comparados os percentuais de células viáveis, apoptóticas e necróticas em cada um dos grupos distintos de tratamento.

Foram feitos os seguintes controles para uso do citômetro de fluxo: 1) Controle (branco) contendo células, sem marcação IP ou anexina V-FITC com função apenas de definir as populações e também a autofluorescência; 2) Controle anexina positivo, contendo células marcadas com anexina V-FITC que foram expostas à luz ultravioleta para induzir a apoptose; 3) Controle anexina negativo, contendo células somente marcadas com anexina V-FITC, sem exposição à luz ultravioleta; 4) Controle IP positivo, contendo células que foram induzidas à necrose por congelamento e marcadas com IP; 5) Controle IP negativo, contendo células sem congelamento e marcadas com IP. Todos esses controles são utilizados para a calibração do equipamento, não constituindo parte do desenho experimental do presente estudo. O controle do ensaio propriamente dito é o tubo contendo anexina-negativo e IP-negativo, ou seja, células cultivadas sem tratamento e sem exposição à luz UV ou ao congelamento.

3.2.6 Ensaio de Zimografia

Para investigar o efeito do extrato de própolis outonal sobre a atividade enzimática de metaloproteinasas de matriz extracelular, especificamente a MMP-9 (gelatinase B ou colagenase IV, 92 kDa) em

HUVECs, foi realizado o método de zimografia (KLEINER; STETLER-STEVENSON, 1994). As células foram semeadas em placas de 24 poços (20.000 células/cavidade) e mantidas em atmosfera úmida com 5% de CO₂ até atingirem confluência. Após, as células foram incubadas com extrato de própolis nas concentrações de 100, 150 e 200 µg/ml durante 24 h. Ao término do tratamento, o sobrenadante foi coletado para a detecção da atividade da MMP-9 secretada pelas HUVECs. O volume do sobrenadante correspondente a 50 mg/ml de proteínas (aproximadamente 40 µl) foi submetido à eletroforese em gel 7,5% de poliacrilamida de dodecil-sulfato de sódio SDS-PAGE com 1,5% de gelatina como substrato para a MMP-9. Após a corrida eletroforética, o gel foi lavado duas vezes em tampão (2,5% de Triton X-100, 1mM CaCl₂ e 0,05% de NaCl) por 1 hora em temperatura ambiente para remover o SDS e, após, foi incubado durante 24 h a 37 °C em tampão enzimático (50 mM de tampão Tris contendo 5 mM de CaCl₂ e 2% de NaCl) pH 7,5. O gel foi marcado com 0,1 % de azul de Coomassie R250, 10% de ácido acético e 25% de etanol por 1 h e descorado por 30 minutos em solução descorante (10% de ácido acético e 25% de etanol em água). A atividade proteolítica foi visualizada como bandas claras (zonas de degradação da gelatina) em contraste ao fundo azul da gelatina marcada. As bandas foram então digitalizadas usando-se um scanner e a intensidade das marcações analisada por meio de software. Os resultados são expressos como intensidade de MMP-9 em relação ao controle. O ensaio foi realizado em duplicata.

3.2.7 Ensaio de Vasculogênese *in vivo*

Com o objetivo de investigar a capacidade do extrato de própolis outonal em inibir a formação de vasos primordiais - vasculogênese - foi realizado o ensaio da membrana vitelínica (MVA) *in vivo*, usado para determinar atividade anti-vasculo-/angiogênica (DIAS et al., 2008a). Este método foi adaptado a partir do ensaio da membrana corioalantóica (MCA) o qual é realizado para quantificar a angiogênese.

O extrato de própolis foi aplicado aos embriões através do implante de discos de metilcelulose após a incubação preliminar de 48 horas em estufa, conforme descrição no item 3.1.5 (E2, estágio 13 - HH; Hamburger e Hamilton). Esses discos (10 µl de volume, solução de metilcelulose 1,5 %) foram submetidos previamente ao processo de secagem em fluxo laminar sobre uma bandeja de metal revestida com Teflon®. Em seguida eles foram destacados da superfície e aplicado (1 disco/embrião) na membrana extra-embriônica de dois dias (E2), próximo do embrião, onde ilhotas sanguíneas estavam presentes. Após estas manipulações as janelas foram fechadas com fita isolante preta e os ovos reincubados até o 4º dia de vida embrionária (96 horas, E4, estágio 23- HH).

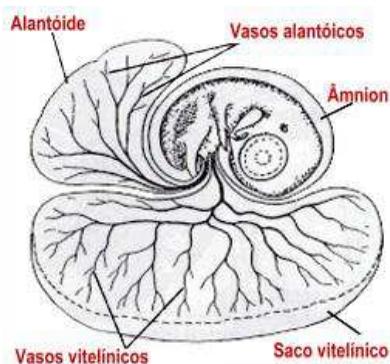
O intervalo de concentrações foi de 50 a 450 mg/kg. A razão fixa entre as concentrações é 3, a qual permite uma relação linear entre as doses e respostas. É importante destacar que os valores de concentrações administradas foram calculados a partir do peso médio dos embriões que corresponde nesse período de desenvolvimento (E4) a 0,042 g. A quantidade de extrato de própolis em cada disco de metilcelulose

contendo as concentrações de 50, 150 e 450 mg/kg é de 0,0021; 0,0063 e 0,0189 mg, respectivamente. Um grupo experimental adicional exposto apenas à metilcelulose foi usado como controle (n=7 por grupo experimental). As concentrações desses ensaios foram determinadas considerando-se o fato de que ao se tratar de um sistema vivo, os vasos estarão sob influência de fatores reguladores (por exemplo, fatores de crescimento). Além disso, a via de administração é a implantação de um disco de metilcelulose a partir do qual a própolis (ao ser liberada paulatinamente) poderá alcançar os vasos sanguíneos presentes na membrana vitelínica. Tal vasculatura é ampla em termos de superfície da membrana extra-embriônica, ou seja, a MVA. O tratamento de 48 horas (E2-E4) tem como objetivo investigar a ação do extrato de própolis na formação de vasos primordiais do embrião, ou seja, nos primeiros vasos sanguíneos (formados pela vasculogênese) através da ação nas ilhotas sanguíneas, as quais são formadas por células progenitoras endoteliais e hematopoiéticas. Por esta razão no 4º dia, os ovos foram retirados da incubadora e a zona ao redor do disco de metilcelulose foi examinada em um microscópio estereoscópico (Olympus; Tóquio, Japão). A inibição da vasculogênese foi determinada de acordo com a diminuição do número de vasos sanguíneos na área ao redor do disco e definida como o percentual de redução no número de vasos comparado com o controle.

Dentre as membranas extra-embriônicas (alantóide, âmnion, córion e saco vitelínico), o saco vitelínico fornece nutrientes necessários para o crescimento do embrião (Figura 21). Durante a incubação, os nutrientes vitelínicos são transportados para o embrião através dos vasos

sanguíneos da MVA, pela endocitose de lipoproteínas e de transportadores de peptídeos, glicose e minerais (YADGARY; UNI, 2011). Durante esse período de desenvolvimento, a vasculogênese ocorre em diversos locais, independentemente, incluindo o próprio embrião e membranas extra-embriônicas. Nela, os angioblastos inicialmente se organizam em um arranjo celular que formará um retículo de tubos primitivos, denominado plexo capilar primário (RISAU, 1997).

Figura 21 - Membranas extra-embriônicas



Fonte: Disponível em: http://chickscope.beckman.uiuc.edu/resources/egg_to_chick/development.html. Acesso em: 13 junho 2013. Ilustração de todas as membranas embrionárias com destaque para o saco vitelínico, altamente vascularizado.

3.2.8 Ensaio de Angiogênese *in vivo*

A primeira parte do desenho experimental desse ensaio *in vivo* é muito similar ao ensaio da MVA. Ele consiste na implantação de um

as manipulações nos embriões, as janelas confeccionadas na casca foram fechadas com fita isolante preta e os ovos foram reincubados até o oitavo dia de vida embrionária (E8). Da mesma forma que no ensaio anterior, as concentrações administradas foram calculadas a partir do peso médio dos embriões na idade embrionária de E8 correspondendo a 1,045 g. A quantidade de extrato de própolis em cada disco de metilcelulose contendo as concentrações de 50, 150 e 450 mg/kg é de 0,052; 0,156 e 0,47 mg, respectivamente.

Devido ao arranjo plano dos microvasos da MCA e a sua proximidade com a superfície, ela tem sido muito usada como modelo experimental para se estudar diversos processos biológicos, tais como transporte de íons, troca de gases e experimento de transplante de tumores. Além destes, a MCA é um modelo muito difundido para estudos de angiogênese (DJONOV; GALLI; BURRI, 2000). Os ensaios de quantificação da angiogênese, utilizando esse modelo foram utilizados por inúmeros autores (FOLKMAN, 1974; NGUYEN; SHING; FOLKMAN, 1994; SONG et al., 2002; LENG et al., 2004; TSUCHIYA et al., 2013; TAN et al., 2003).

Entretanto, o uso da MCA, como um modelo experimental, requer conhecimento sobre as mudanças da dinâmica da morfologia vascular durante a incubação. Análises morfométricas mostraram que a vascularização da MCA passa por três fases de desenvolvimento. A fase inicial (5-7 dias) é caracterizada por intensa proliferação celular endotelial com múltiplos brotamentos capilares invadindo o mesênquima, os quais se fundem e formam um plexo capilar primário. Durante a fase intermediária (8-12 dias), a atividade proliferativa

diminui em mais de 50% (novos vasos surgem do remodelamento de células já presentes) e os brotamentos não são mais observados; eles são substituídos por formações intussusceptivas com frequência máxima até o dia 11. Durante a fase tardia (13 dias em diante), aumenta o crescimento em comprimento e volume dos tubos formados anteriormente e a morfologia arterial e venosa torna-se distinta (DJONOV; GALLI; BURRI, 2000).

Desta forma, o período experimental (E6-E8) avalia a ação do extrato de própolis na fase na qual ocorre intensa proliferação celular endotelial com formação de plexo capilar. No E8 os embriões são retirados da incubadora e examinados em um microscópio estereoscópico (Olympus; Tóquio, Japão). A inibição da angiogênese ao redor do disco de metilcelulose foi determinada pela diminuição do número de vasos sanguíneos nessa região e definida como o percentual dessa redução comparado ao controle (disco contendo apenas metilcelulose).

3.2.9 Análise Estatística

Cada experimento *in vitro* e *in vitro* foi realizado no mínimo três vezes e todos os valores são apresentados como média \pm EPM em triplicatas. ANOVA de uma via seguida do teste Tukey foi usado para analisar a significância estatística de todos resultados (software Statistica 6®.). Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Para a confecção dos gráficos apresentados foi utilizado o software GraphPad Prism 4®.

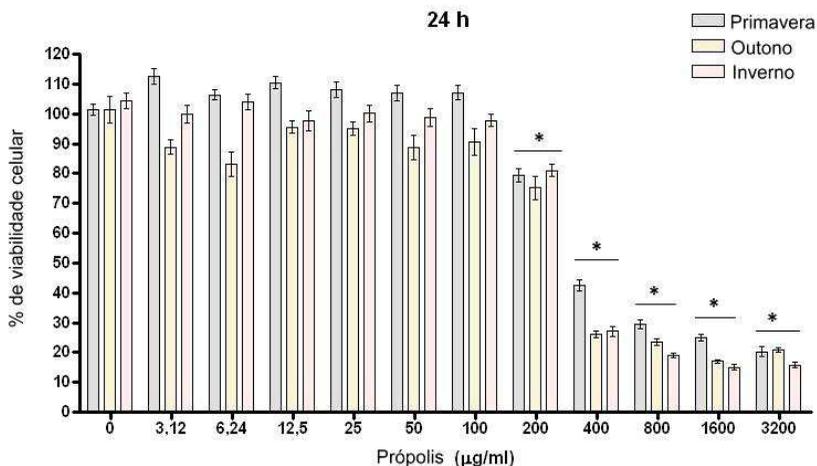
4 RESULTADOS

4.1 EFEITO DE AMOSTRAS SAZONAIS DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA PRÓPOLIS NA VIABILIDADE DE HUVEC

Primeiramente, foi examinado o efeito de concentrações crescentes de três amostras sazonais de extrato de própolis (outono, primavera e inverno, 3,12-3.200 µg/ml) sobre a viabilidade da linhagem HUVEC através do ensaio de citotoxicidade pelo MTT. O ensaio foi conduzido em dois tempos independentes (períodos de 24 e 72 horas) com o objetivo de testar a ação do tempo sobre o extrato. Em ambos os tempos de exposição à própolis o percentual de células viáveis (células vivas) dos diferentes tratamentos foi comparado ao percentual do controle o qual consiste em células cultivadas apenas em meio de cultura.

Em 24 horas de tratamento (Gráfico 1), as três amostras de extrato de própolis mostraram uma ação muito similar, não evidenciando diferenças estatísticas entre as estações dentro de cada uma das concentrações analisadas. Porém, é notável o fato de que nenhuma das amostras provocou efeito sobre a viabilidade das células, nas concentrações de 100, 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,12 µg/ml. Diferenças significativas foram evidenciadas apenas nos tratamentos acima de 200 µg/ml ($p < 0,0001$).

Gráfico 1 - Efeito de extratos hidroalcoólicos (3) de própolis na viabilidade celular em 24 h



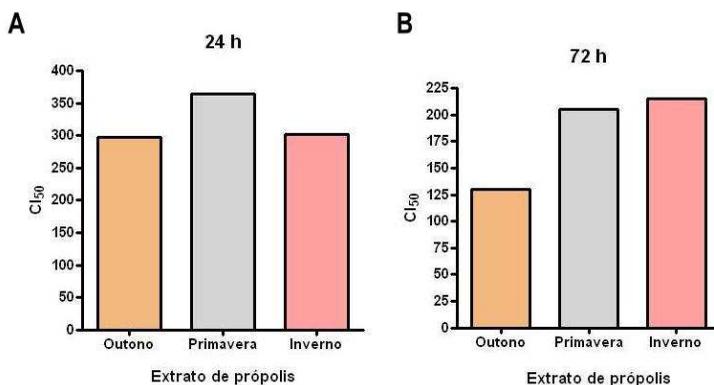
Amostras de própolis de outono, primavera e inverno em 24 horas de tratamento sobre a viabilidade celular de HUVEC através do ensaio de MTT. As barras representam médias \pm EPM. * $p < 0,0001$, *versus* o controle.

Contudo, apesar dos tratamentos entre 800 e 3.200 $\mu\text{g/ml}$ diferirem estatisticamente do controle ($p < 0,0001$), essas concentrações não mostraram diferenças significativas entre os respectivos tratamentos sazonais, mostrando que acima de 800 $\mu\text{g/ml}$ o percentual de viabilidade mantém-se, em aproximadamente 30% de células viáveis na cultura, não alcançando total diminuição das mesmas, mesmo com a maior concentração empregada no ensaio.

No que diz respeito à concentração citotóxica (CC_{50}), visualizamos que a amostra de própolis do outono obteve o menor valor. Essa amostra, nas concentrações de 200 e 400 $\mu\text{g/ml}$, diminuiu significativamente o número de células viáveis para 75% e 26%, respectivamente; a amostra de primavera nas mesmas concentrações,

diminuiu a viabilidade das células em 79% e 42%, respectivamente; a amostra de inverno mostrou uma diminuição de 80% e 27%, respectivamente. Os valores de CC_{50} para as três amostras (outono, primavera e inverno) corresponderam a 297, 364 e 302 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente (Gráfico 2 A).

Gráfico 2 - Valores de CI_{50} em 24 e 72h

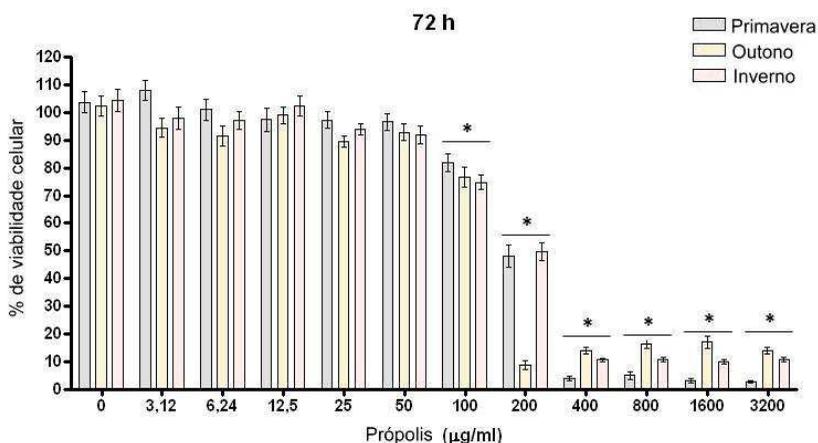


Os valores de CC_{50} para as três amostras (outono, primavera e inverno) em 24 h corresponderam a 297, 364 e 302 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. Em 72 horas, esses valores de CC_{50} para as três amostras (outono, primavera e inverno) foram 130, 205 e 215 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente.

De maneira diferente, no tratamento com 72 horas de exposição ao extrato de própolis, a amostra de própolis outonal obteve significância estatística a partir de 100 $\mu\text{g/ml}$, com diminuição para 76% no número de células viáveis evidenciando que o fator tempo de exposição é variável importante na ação da própolis sobre as HUVECs. A diminuição da viabilidade na concentração de 200 $\mu\text{g/ml}$ correspondeu a 8% de células viáveis na cultura. Queda expressiva

quando comparada ao valor de 75% do tratamento de 24 horas, na mesma concentração. Os tratamentos de 72 h entre 400 e 3.200 $\mu\text{g/ml}$ também diferiram do controle ($p < 0,0001$) e não diferiram entre si, mantendo um percentual em torno de 20% de células viáveis (Gráfico 3) e, da mesma forma que no ensaio anterior, não obteve a total depleção da cultura.

Gráfico 3 - Efeito de extratos hidroalcoólicos (3) de própolis na viabilidade celular em 72 h



Amostras de própolis de outono, primavera e inverno em 72 horas de tratamento sobre a viabilidade celular de HUVEC através do ensaio de MTT. As barras representam médias \pm EPM. * $p < 0,00005$, *versus* o controle.

Com relação à CC_{50} , da mesma forma que o ensaio com 24 horas de exposição, a amostra de outono obteve um valor menor de inibição. Essa amostra, nas concentrações de 100 e 200 $\mu\text{g/ml}$, diminuiu o número de células viáveis para 76% e 8%, respectivamente; a amostra de primavera nas mesmas concentrações, diminuiu a viabilidade das

células em 81% e 48%, respectivamente; a amostra de inverno obteve queda de 74% e 49%, respectivamente. Os valores de CC_{50} para as três amostras (outono, primavera e inverno) corresponderam a 130, 205 e 215 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente (Gráfico 2 B).

Ao compararmos a diminuição da CI_{50} em ambos os tempos de tratamento, temos uma diminuição de 56% entre os períodos de exposição de 24 h (297 $\mu\text{g/ml}$) e 72 h (130 $\mu\text{g/ml}$), com a amostra de própolis de outono. A queda nos valores de CC_{50} referente à própolis de primavera e inverno foi de 44% e 29%, respectivamente, em função do aumento do tempo de exposição.

Assim, devido ao fato de que a própolis outonal mostrou ser mais efetiva na redução da viabilidade celular, ou seja, uma ação citotóxica mais pronunciada quando comparada às outras duas amostras, e também pelo fato de possuir um menor valor de CC_{50} , ela foi selecionada para os ensaios subsequentes (proliferação celular, migração celular, tubulogênese, morte celular, zimografia e ensaios *in vivo*). Destaca-se, ainda, o fato de que, de acordo com Oliveira e Bastos (2011), para que um composto químico possa exercer atividade biológica, o mesmo deve atingir o alvo fisiológico numa concentração mínima, na qual se possa determinar tanto esse efeito biológico, quanto o mecanismo da ação.

4.2 EFEITO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA PRÓPOLIS OUTONAL NA PROLIFERAÇÃO DE HUVEC

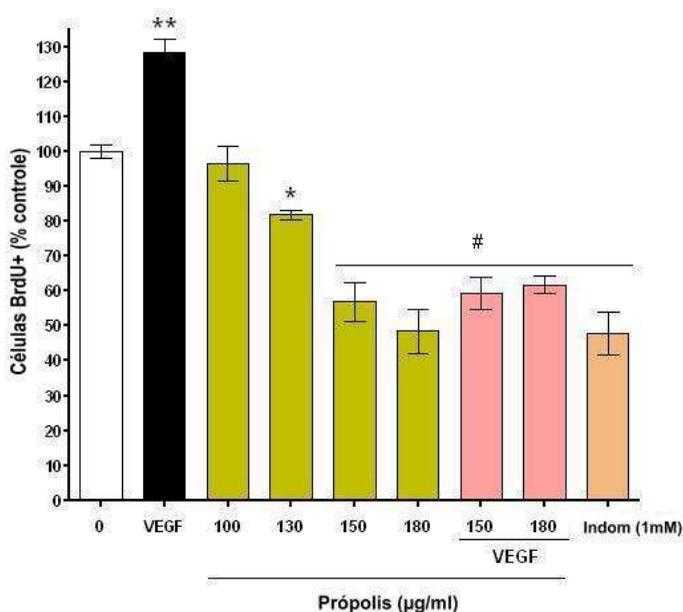
Em seguida, para uma avaliação específica da proliferação celular endotelial, um evento importante na angiogênese, foi investigado se a

própolis outonal poderia inibir a proliferação das células endoteliais. Em um primeiro ensaio foram testadas as concentrações de 12,5 à 400 µg/ml em 24 horas de exposição. Nenhum efeito significativo foi encontrado (dados não mostrados). Em seguida, o próximo ensaio foi executado para testar a ação do extrato nessas mesmas concentrações porém com maior tempo de tratamento (72 h). Observou-se queda significativa e pronunciada apenas nas concentrações entre 200 e 400 µg/ml de extrato de própolis outonal (dados não mostrados). A partir dessa constatação, o passo seguinte foi determinar em qual janela de concentração exata encontraríamos uma linearidade na ação anti-proliferativa da própolis. Assim, testamos concentrações compreendidas entre a última concentração que não mostrou significância em 72 horas - 100 µg/ml - e a primeira concentração que mostrou significância - 200 µg/ml - para alcançarmos um intervalo linear de efeitos. Portanto, o próximo ensaio foi executado para testar os valores aproximados, que seguem: 100, 130, 150 e 180 µg/ml (intervalo de 30 µg/ml entre cada concentração).

Em 72 horas de exposição, 100 µg/ml de extrato de própolis outonal manteve o seu efeito sobre a proliferação celular de forma semelhante ao ensaio anterior, ou seja, não promoveu efeitos anti-proliferativos. Entretanto as concentrações acima deste valor (130, 150 e 180 µg/ml) diminuíram pronunciadamente a proliferação para 81,7; 56,8 e 48,4% respectivamente, quando comparado ao controle (Gráfico 4, Figura 22). Além disso, a própolis outonal (150 – 180 µg/ml) também bloqueou o potente efeito proliferativo do VEGF (50 ng/ml) quando ambos os compostos foram administrados em associação ($p < 0,01$). Ao mesmo tempo, a indometacina (1 mM), inibidor não-seletivo de COX-1

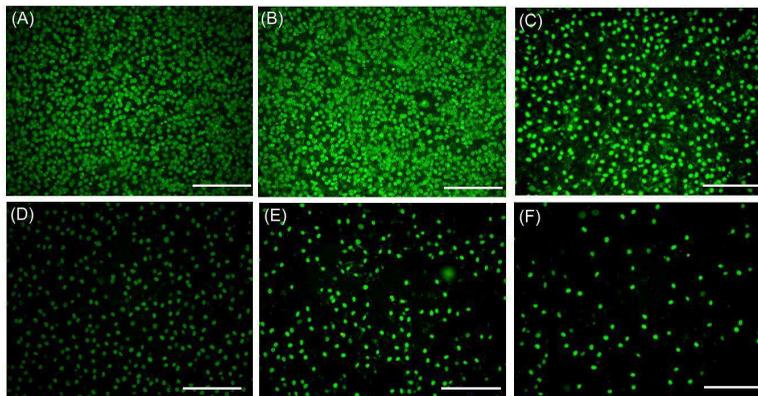
e COX-2, diminuiu significativamente a proliferação celular evidenciando valores similares aos alcançados pela administração da própolis outonal com 180 $\mu\text{g/ml}$, isoladamente ($p < 0,001$; Gráfico 4, Figura 23).

Gráfico 4 - Efeito da própolis outonal na proliferação celular



A proliferação celular foi avaliada por meio de contagem manual. HUVECs foram incubadas com concentrações crescentes de própolis (100 - 180 $\mu\text{g/ml}$) isolada ou e em associação com VEGF (50 ng/ml) durante 72 h. Indometacina (1 mM) foi também testada. As células incubadas apenas com meio de cultura (veículo) foram usadas como grupo controle. Experimentos foram realizados em triplicata. Barras representam a média \pm EPM. * p < 0,05, ** p < 0,01 e # p < 0,001 comparado ao controle.

Figura 23 - Fotomicrografias do ensaio de proliferação celular (células BrdU+)



Imagens representativas são mostradas. A proliferação celular foi avaliada pela incorporação com o análogo timidina (BrdU) dentro do DNA pelo método de imunocitoquímica (células marcadas em verde). HUVEC foram incubadas com as concentrações indicadas de própolis na presença ou ausência de VEGF (50 ng/ml) durante 3 dias a 37°C, com umidade e 5% de CO₂. (A) Controle (apenas meio de cultura), (B) 50 ng/ml VEGF, (C) 100 µg/ml de própolis, (D) 150 µg/ml de propolis, (E) 180 µg/ml de própolis e (F) indometacina (1 mM). Barra de escala: 100µm (magnificação de 10X).

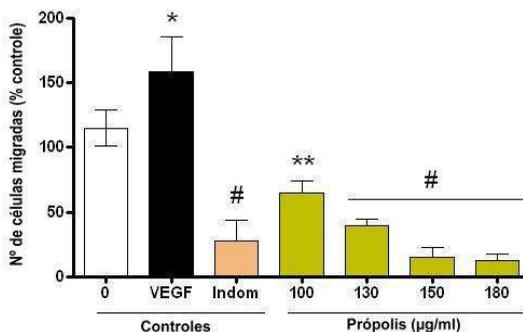
Os resultados representados no Gráfico 4 e Figura 23 quanto aos efeitos da administração da própolis (100 – 180 µg/ml) ou indometacina (1 mM) não necessariamente distinguem entre uma diminuição do número de células devido a mecanismos de inibição proliferativa e eventos de morte celular induzidos sobre as células endoteliais em estudo.

4.3 EFEITO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA PRÓPOLIS OUTONAL NA MIGRAÇÃO DE HUVEC

Devido à migração celular constituir um evento essencial no processo de angiogênese (PHILIPS et al., 1991), o efeito da própolis na migração de HUVEC foi avaliado por meio do ensaio de formação de cicatriz sobre uma monocamada celular (*wound-healing assay*) em placas de 24 cavidades na qual uma cicatriz foi feita em linha reta com o uso de uma ponteira de pipeta (10 - 200 μ l).

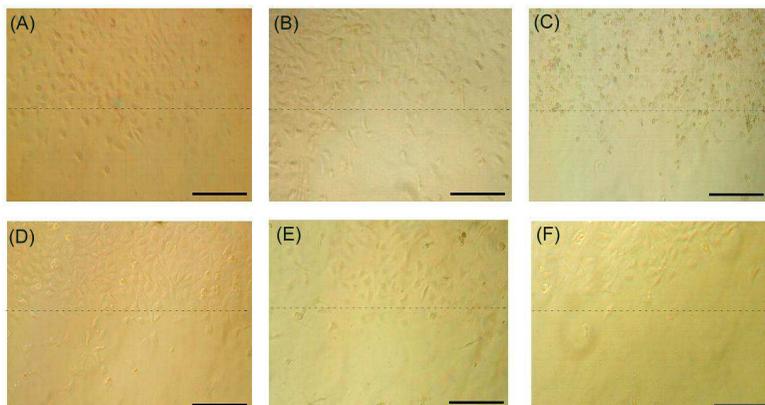
Após um período de 24 horas de exposição ao extrato de própolis outonal nas concentrações de 100, 130, 150 e 180 μ g/ml, verificou-se significativa diminuição do número de células no evento migratório em 35, 51, 85 e 87% respectivamente, quando comparado ao grupo controle (Gráfico 5, Figura 24).

Gráfico 5 - Efeito da própolis outonal na migração celular



Número estimado de HUVEC em migração pela mensuração do número de células dentro da região delimitada pela cicatriz após 24 h de exposição (100 – 180 μ g/ml); VEGF (50 ng/ml) e indometacina (1 mM). Barras representam a média e \pm EPM do número de células migradas em 3 campos microscópicos diferentes sobre um aumento de 25 X. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e # $p < 0,001$, *versus* o controle.

Figura 24 - Fotomicrografias do ensaio de migração celular



Imagens representativas são mostradas. A linha pontilhada indica a borda da cicatriz. (A) Células cultivadas apenas em meio de cultura (controle negativo), (B) Células cultivadas com 50 ng/ml VEGF-A, (C) Células cultivadas com indometacina (1 mM), (D) Células cultivadas com 130 µg/ml de própolis, (E) Células cultivadas com 150 µg/ml de própolis e (F) Células cultivadas com 180 µg/ml de própolis. Barra de escala: 50µm (magnificação de 25X).

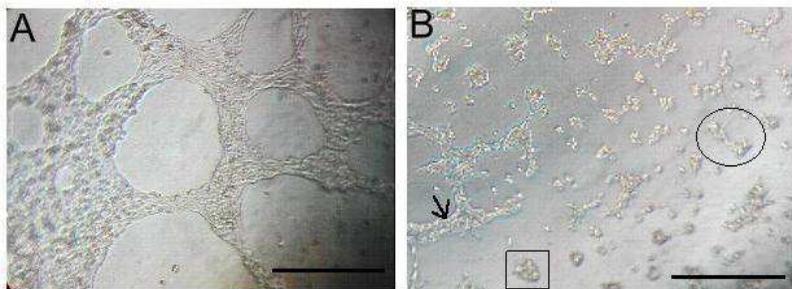
Além disso, o tratamento com indometacina (1 mM) diminuiu a migração em 72,7% ($p < 0,001$). Como ilustrado no Gráfico 5, no grupo tratado com VEGF, o número de células migrando foi marcadamente aumentado em 28,4%, comparado ao grupo controle ($p < 0,05$).

4.4 EFEITO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA PRÓPOLIS OUTONAL NA TUBULOGÊNESE DE HUVEC

O objetivo seguinte foi investigar a ação do extrato de própolis outonal quanto à capacidade das HUVEC para formar redes capilares ramificadas semelhantes a tubos (tubulogênese) quando cultivadas em um substrato de Matrigel®.

As células endoteliais foram cultivadas no Matrigel® durante 24 horas apenas em meio de cultura RPMI-1640 (controle) levando à organização de uma malha de microtubos com um arranjo típico do processo de tubulogênese (Figura 25 A). Células cultivadas sobre Matrigel® em meio de cultura enriquecido com extrato de própolis outonal (150 - 200 $\mu\text{g/ml}$) diminuiu de forma significativa o processo de tubulogênese em aproximadamente 70% quando comparado ao controle ($p < 0,001$). Nos poços contendo o extrato de própolis na concentração de 200 $\mu\text{g/ml}$ foi possível observar a presença de redes inacabadas de tubos bem como aglomerados celulares (Figura 25 B).

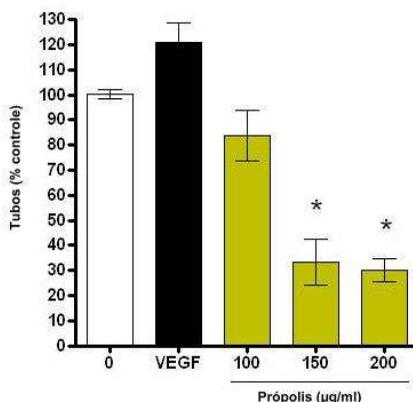
Figura 25 - Fotomicrografias do ensaio de tubulogênese



As células formaram tubos sobre placas revestidas com Matrigel® e incubadas com concentrações crescentes de própolis. (A) Fotomicrografia de arranjo de estruturas semelhantes a tubos em cultura de HUVEC após tratamento apenas com meio de cultura RPMI-1640 (controle). (B) Fotomicrografia de células incubadas com meio de cultura contendo 200 $\mu\text{g/ml}$ de própolis; como ilustrado, aglomerados celulares, estruturas imitando tubos bem como redes inacabadas de tubos foram encontrados (representados pelo quadrado, círculo e flecha, respectivamente). Foram realizadas triplicatas de cada grupo experimental e visualizados em microscopia invertida (magnificação 25X). Barra de escala: 50 μm .

Além disso, a despeito de exercer ação não estatisticamente significativa no Matrigel®, o tratamento com 50 ng/ml de VEGF indicou uma tendência para promover a tubulogênese de HUVEC em 21%, quando comparado ao controle (veículo; Gráfico 6).

Gráfico 6 - Ação da própolis na tubulogênese



Quantificação da tubulogênese (% de formação de tubos). Barras representam o \pm EPM das estruturas semelhantes a tubos comparado ao controle. * $p < 0,001$.

4.5 EFEITO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA PRÓPOLIS OUTONAL NO ENSAIO DE MORTE CELULAR

A citometria de fluxo foi o método empregado na presente investigação para determinar a ocorrência e também o tipo de morte celular desencadeada pela exposição de células da linhagem HUVEC ao extrato de própolis sob estudo. A citometria de fluxo foi realizada através da marcação das células endoteliais com anexina V-FITC e iodeto de propídio para analisar quantitativamente o percentual de

células apoptóticas e necróticas, respectivamente, em função do tempo de exposição ao extrato (72 h).

Conforme descrito na metodologia, a anexina V-FITC marca as células em processo de apoptose e o iodeto de propídio marca as células em processo de necrose. Deve-se destacar que apenas uma parte do número total de células - as células viáveis – passará pela leitura do citômetro de fluxo. A análise quantitativa de morte celular foi realizada nas culturas após 72 horas de exposição. Os percentuais relativos às células apoptóticas, necróticas e a quantidade absoluta de células viáveis de todas as concentrações analisadas são representados na Tabela 5.

Tabela 5 -Número de células viáveis, apoptóticas e necróticas.

Tratamento	Células viáveis	Apoptose	Necrose
Controle	7328	15,2% (1113)	14,9% (1091)
VEGF (50 ng/ml)	7502	15,5% (1162)	10,9% (817)
U0126 (5 µM)	7299	17,0% (1240)	13,2% (963)
100 µg/ml	7122	7,6% (541)	8,0% (569)
130 µg/ml	6773	4,7% (318)	9,0% (609)
150 µg/ml	6913	14,1% (974)	18,9% (1306)
180 µg/ml	6800	16,5% (1122)	23,0% (1564)
150 µg/ml+VEGF	6822	13,0% (886)	23,3% (1589)
180 µg/ml +VEGF	6828	10,2% (696)	26,2% (1788)
150 µg/ml +U012	3276	22,0% (720)	29,9% (979)
180 µg/ml +U0126	3187	17,0% (541)	33,5% (1067)

Número de células viáveis e os respectivos valores e percentuais de células: viáveis, em apoptose e em necrose. O VEGF foi utilizado na concentração de 50 ng/ml e o U0126 (inibidor de ERK1/2) na concentração de 5 µM.

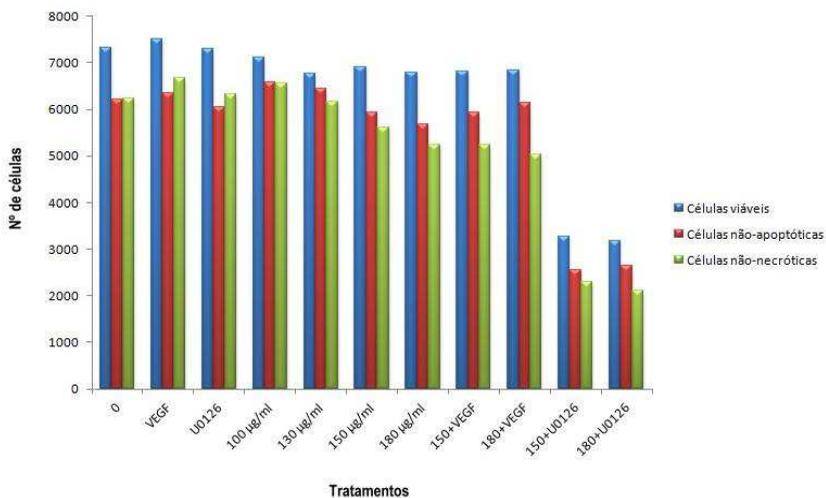
As células tratadas com VEGF (50 ng/ml), U0126 (5 μ M) ou extrato de própolis (150 e 180 μ g/ml) parecem não modificar o padrão de apoptose em relação ao controle (15,2%). No entanto, os tratamentos utilizando o U0126 em coadministração com a própolis (150 μ g/ml), mostrou um percentual mais elevado de morte celular por apoptose. Em contrapartida, nos tratamentos contendo 150 e 180 μ g/ml de própolis em associação com o VEGF, mostraram uma tendência a valores relativamente reduzidos de morte celular por apoptose (13 e 10,2%, respectivamente, comparado ao controle). As concentrações mais baixas do extrato de própolis (100 e 130 μ g/ml), mostraram valores também reduzidos de apoptose em relação ao controle (7,6% e 4,7%, respectivamente).

Com relação aos valores de morte celular por necrose, verificou-se que os maiores percentuais obtidos correspondem aos tratamentos com VEGF (50 ng/ml) e U0126 (5 μ M) quando associados ao extrato de própolis (150 e 180 μ g/ml), bem como a maior concentração isolada do extrato de própolis (180 μ g/ml), quando comparado ao controle (14,9%). Em especial, o aumento do número de células em processo de necrose, em relação ao controle, torna-se evidente quando a própolis foi administrada junto com o inibidor de ERK1/2 (U0126), proteína envolvida na cascata da proliferação celular, evidenciando um possível efeito aditivo decorrente da respectiva associação (29,9% e 33,5%). Além disso, a observação desses valores percentuais de extrato de própolis combinado com o U0126, com base na relação percentual de células necróticas sobre as apoptóticas, em especial a concentração de 180 μ g/ml de extrato de própolis, reforça o argumento acima e sugere

uma ação pró-necrótica executada pelo extrato de própolis outonal na linhagem HUVEC. A partir dos dados expostos na Tabela 5, pode-se observar que os tratamentos apenas com o extrato de própolis promoveram valores mais elevados de morte por necrose quando comparado aos percentuais de células apoptóticas. Tal fato não ocorreu com a administração isolada de VEGF (10,9%) e nem, tampouco, com U0126 (13,2%).

A análise dos resultados do ensaio de morte celular por meio de citometria de fluxo, indicam uma tendência que a morte celular verificada ocorra não essencialmente por via de apoptose, mas estaria ainda sendo suplantada pelos eventos de morte celular não-apoptótica (principalmente necróticos). Portanto, ambos os eventos deletérios seriam responsáveis pela diminuição de células vivas na população de HUVEC nos grupos tratado e não-tratado em estudo. A relação apoptose/necrose pode ser melhor visualizada no Gráfico 7.

Gráfico 7 - Números absolutos de células viáveis



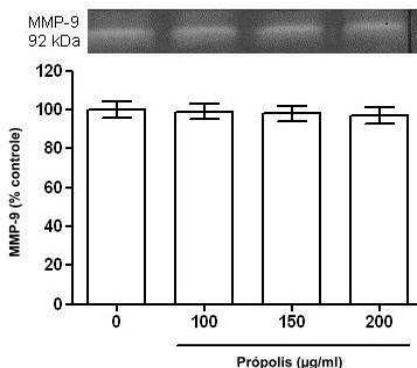
As células apoptóticas foram marcadas com anexina V-FITC (conjugada a um fluoróforo) e as células necróticas foram marcadas com IP. A barra azul corresponde ao número de células viáveis totais no final do experimento. A barra vermelha corresponde ao número de células que após receberem anexina V-FITC não sofreram apoptose. A barra verde corresponde ao número de células que após receberem IP não sofreram necrose. A análise pelo citômetro foi realizada a partir de um *pool* de células.

4.6 EFEITO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA PRÓPOLIS NA ATIVIDADE DA MMP-9

O próximo passo foi identificar se o extrato de própolis outonal exerce efeito na atividade de MMPs, devido ao fato de serem enzimas envolvidas na degradação da lâmina basal na etapa inicial da angiogênese. Os ensaios de zimografia mostraram que a MMP que foi expressa no gel de poliacrilamida foi a MMP-9. De acordo com o dado apresentado no Gráfico 8, não houve diferença estatística entre os

tratamentos com 24 h de exposição ao extrato de própolis outonal (100, 150 e 200 $\mu\text{g/ml}$) na intensidade de MMP-9 nas HUVECs.

Gráfico 8 - Ação da própolis outonal na atividade da MMP-9



O % da intensidade de MMP-9 das culturas expostas ao extrato de própolis outonal foram comparados ao controle. ANOVA (de uma via) não evidenciou diferenças significativas.

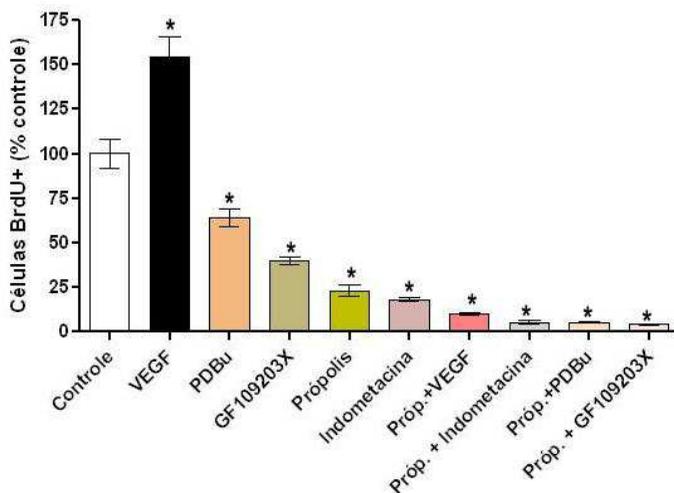
4.7 EFEITO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA PRÓPOLIS OUTONAL NA ATIVIDADE DA PKC E COX

O próximo ensaio realizado foi para responder ao seguinte questionamento: O extrato de própolis outonal exerce sua ação antiangiogênica através das vias de sinalização envolvendo a PKC e a COX? Para responder a essa nova pergunta, ensaios adicionais de proliferação celular foram executados utilizando GF109203X (5 μM , inibidor da PKC), PDBu (100 nM, ativador da PKC) e indometacina (1 mM, inibidor não-seletivo COX) de forma isolada ou em coadministração com o extrato de própolis outonal.

Conforme se observa no Gráfico 9, todos os tratamentos isolados bem como todas as coadministrações mostraram diferenças significativas em relação ao controle ($p < 0,001$). O tratamento com extrato de própolis de forma isolada (200 $\mu\text{g/ml}$), obteve uma queda na proliferação celular de 78% em relação ao grupo controle. Ao administrar o inibidor, GF109203X (5 μM) e o ativador, PDBu (100 nM) da PKC nas culturas obteve-se uma queda na proliferação de 60% e 37%, respectivamente, em comparação ao grupo controle. O inibidor não seletivo de COX mostrou uma queda de 82% de células na cultura quando comparado ao controle, evidenciando a sua ação inibitória na atividade proliferativa da HUVEC. Em contrapartida, o VEGF promoveu uma elevação do número de células da cultura em torno de 54,4% de atividade proliferativa.

Nos tratamentos com coadministrações com o extrato de própolis na concentração de 200 $\mu\text{g/ml}$, pode-se notar um queda na atividade proliferativa geral em todos os tratamentos. Os valores de redução foram: 89,7%; 96%, 94,7% e 94,7% nos poços coadministrados com VEGF, GF109203X, PDBu e indometacina, respectivamente. Esses dados sugerem que o extrato de própolis promove uma inibição na ação da PKC durante a fase proliferativa da angiogênese ou, ainda, que uma reação de ambos os compostos associados (Própolis + PDBu) possa estar propiciando um antagonismo farmacológico e emitindo o efeito anti-proliferativo. Além de sugerir, ainda, uma ação aditiva da inibição na ação da COX1/2 (Própolis + Indometacina) e uma reversão no efeito proliferativo do VEGF nas células (Própolis + VEGF, $p < 0,001$).

Gráfico 9 - Ação da própolis na sinalização de PKC e COX



A proliferação celular foi avaliada por meio de contagem manual. HUVECs foram incubadas com VEGF (50 ng/ml), extrato de própolis (200 µg/ml), GF109203X (5 µM), PDBu (100 nM) e indometacina (1mM) isolada ou e em associação. As células incubadas apenas com meio de cultura foram usadas como grupo controle. Experimentos foram realizados em triplicata. Barras representam a média ±EPM. *p < 0,001 comparado ao controle.

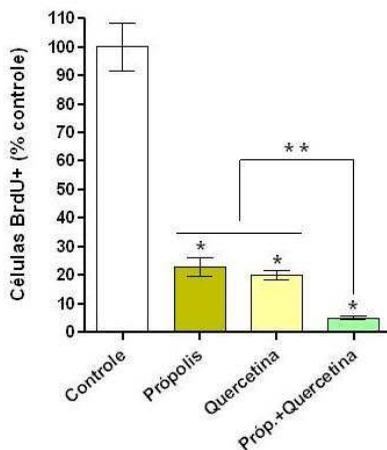
4.8 EFEITO DA QUERCETINA NA PROLIFERAÇÃO DE HUVEC

Contudo, os dados anteriores fizeram surgir um novo questionamento: O efeito antiangiogênico da própolis está relacionado aos níveis elevados do composto quercetina identificados na sua composição? Para responder a essa pergunta, novos ensaios de proliferação celular foram executados utilizando-se o composto puro quercetina (40 µM).

Conforme os dados apresentados no Gráfico 10, observamos que o tratamento com quercetina produziu uma diminuição expressiva de

80% de células na cultura, similar ao efeito produzido com o tratamento apenas com extrato de própolis ($p < 0,001$). Por outro lado, a associação de própolis e quercetina diferiu estatisticamente do efeito promovido pelo extrato de própolis e da quercetina isolados no qual foi possível observar uma queda na proliferação de 95% ($p < 0,05$). Esse dado evidencia a elevada inibição no momento em que esses dois últimos são administrados em associação, sugerindo que a quercetina possa vir a ser o composto da própolis pelo qual o mecanismo celular de proliferação é modulado no intuito de diminuir a mitose de células endoteliais e, conseqüentemente, a angiogênese.

Gráfico 10 - Ação da quercetina na proliferação de HUVEC

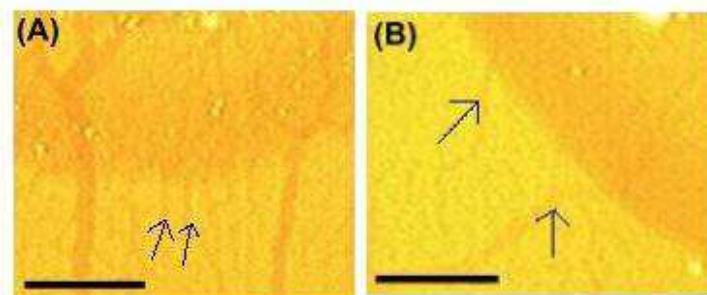


A proliferação celular foi avaliada por meio de contagem manual. HUVECs foram incubadas com extrato de própolis (200 $\mu\text{g/ml}$) e quercetina (40 μM) isolada ou em associação. As células incubadas apenas com meio de cultura foram usadas como grupo controle. Experimentos foram realizados em triplicata. Barras representam a média \pm EPM. * $p < 0,001$ e ** $p < 0,05$ comparado ao controle.

4.9 EFEITO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA PRÓPOLIS OUTONAL NA VASCULOGÊNESE *IN VIVO*

O ensaio da MVA de embriões de *Gallus domesticus* com 4 dias de incubação, foi um ensaio *in vivo* usado inicialmente para determinar se o extrato de própolis outonal exibiria atividade antivascular em vasos primordiais. Desta forma, após 2 dias de implantação do disco de metilcelulose (E4), o grupo controle (apenas solução de metilcelulose sem extrato) exibiu fisiologicamente o desenvolvimento de vasos vitelínicos primários (Figura 26 A). Ele desenvolveu uma média de 26 vasos vitelínicos no limite do disco implantado.

Figura 26 - Fotomicrografias do ensaio de vasculogênese

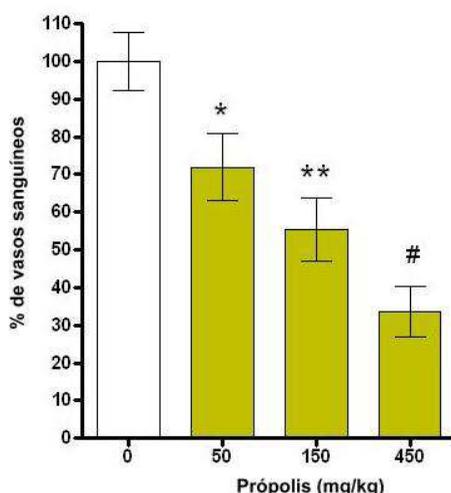


(A) Controle (apenas metilcelulose); (B) 450 mg/kg de própolis. Barra de escala: 50 μm . Flechas apontam para os vasos sanguíneos. É possível visualizar a borda do disco em grande aumento (20X).

Os grupos tratados com concentrações crescentes de extrato de própolis (50, 150 e 450 mg/kg; um disco por embrião) mostraram uma diminuição, de forma dose-dependente, da ordem de 28,1%; 44,6% e 66,5%, respectivamente, no número de vasos ao redor do disco. Esses

resultados demonstram um efeito anti-vasculogênico, bem como efeito antiangiogênico da própolis administrada, neste modelo de estudo (Gráfico 11, Figura 26).

Gráfico 11 - Efeito do extrato hidroalcoólico da própolis na vasculogênese *in vivo*



Efeito inibitório da própolis outonal sobre a formação de vasos primordiais da MVA de embriões (E4). Resultados são expressos como percentual de redução no número de microvasos ao redor do disco comparado ao número de vasos do controle. Cada barra representa a média \pm EPM de sete embriões. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$ e # $p < 0,0001$.

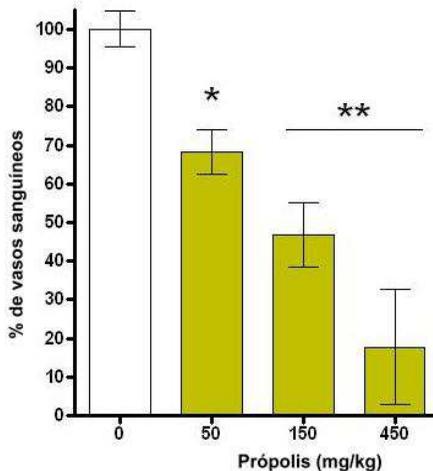
4.10 EFEITO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA PRÓPOLIS OUTONAL NA ANGIOGÊNESE *IN VIVO*

Para confirmar a atividade antiangiogênica exercida pela própolis em estudo nos vasos embrionários iniciais (E2 – E4), foi em seguida

realizado o ensaio da MCA o qual é amplamente usado como modelo *in vivo* para o estudo da angiogênese em embriões tardios (E6 – E8).

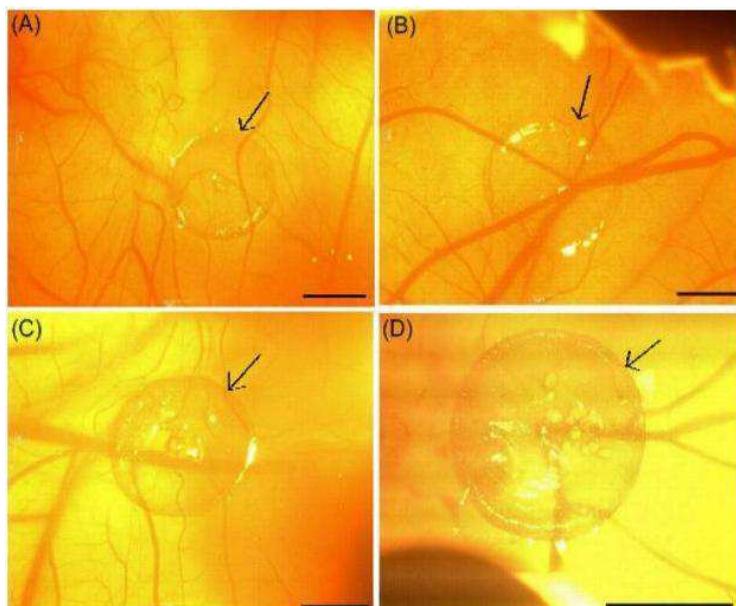
Como ilustrado no Gráfico 12, os grupos tratados com concentrações crescentes de própolis (50, 150 e 450 mg/kg) sofreram inibição de forma dose-dependente em 31,8 %; 53,5% e 82,3%, respectivamente, na formação desses vasos, comparando-se ao grupo controle, o qual desenvolveu uma média de 15,2 vasos corioalantóicos ao redor do limite do disco. Além disso, o grupo que recebeu tratamento de 450 mg/kg foi observado um bloqueio elevado no processo de angiogênese na MCA (Gráfico 12, Figura 27).

Gráfico 12 - Ação da própolis na angiogênese *in vivo*



Resultados são expressos como percentual de redução no número de microvasos ao redor do disco contendo própolis comparado ao número de vasos presentes nos grupos controles. Cada barra representa a média \pm EPM de sete embriões. * $p < 0,001$ e ** $p < 0,0001$.

Figura 27 - Fotomicrografias do ensaio de angiogênese



Efeito inibitório da própolis outonal na vascularização da MCA de um embrião de 8 dias. (A) Controle (apenas metilcelulose); (B) Disco contendo 50 mg/kg; (C) Disco contendo 150 mg/kg; (D) Disco contendo 450 mg/kg. Barra de escala: 50 μ m. Magnificância 20X.

5 DISCUSSÃO

A presente investigação consistiu em estudar a ação do extrato hidroalcoólico de própolis, coletada no outono na região da serra catarinense (2010), na formação de vasos sanguíneos. Foi encontrado que o extrato outonal promoveu atividade inibitória na vasculogênese/angiogênese *in vivo*. Essa inibição foi confirmada *in vitro* nos mecanismos celulares de proliferação, migração e tubulogênese de HUVEC.

De acordo com Newman e Cragg (2007), cerca de 47% dos fármacos disponíveis atualmente foram desenvolvidos a partir de fontes naturais. São muitos os compostos isolados derivados de produtos naturais que possuem efeitos na formação de vasos sanguíneos (REDDY et al., 2003; AHN et al., 2007; DIAS et al., 2008b; LOPES et al., 2009; KUNIMASA et al., 2010; PRATHEEHSKUMAR et al., 2012; ZHANG et al., 2013). Nesse cenário, a própolis surge como uma biomassa muito promissora a ser estudada, uma vez que os produtos naturais vêm recuperando espaço e importância na indústria farmacêutica atuando como fonte inspiradora de novos padrões moleculares bioativos (VIEGAS; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

Primeiramente, foi analisado a viabilidade de células da linhagem HUVEC expostas a concentrações crescentes de três amostras sazonais distintas de própolis (primavera, outono e inverno; 3,12 - 3.200 µg/ml) pelo método de citotoxicidade do MTT.

No que concerne à amostra de própolis outonal, valores significativos de citotoxicidade foram obtidos somente acima de 100 e

200 $\mu\text{g/ml}$ em 72 e 24 h de exposição, respectivamente. Os tratamentos em 24 h de exposição com concentrações acima de 200 $\mu\text{g/ml}$ diminuíram o número de células viáveis em torno de 25% ($p < 0,0001$). No entanto, quando o período de exposição da célula nessa mesma concentração foi aumentado para 72 h, a perda em viabilidade celular atingiu 87% das células em cultura, evidenciando a importância do efeito do tempo de exposição da substância. Padrões similares de resposta foram obtidos entre as amostras de própolis coletadas nos períodos de primavera e de inverno. Contudo, ao compararmos a CC_{50} das três amostras, foi a amostra de outono que obteve o menor valor, sendo 297 $\mu\text{g/ml}$ para 24 h e 130 $\mu\text{g/ml}$ para 72 h de exposição. Essa concentração representa a citotoxicidade do extrato necessária para matar 50% de células na cultura (CC_{50}). Fato interessante é que a amostra outonal foi a que apresentou as menores concentrações de flavonóides e ácidos fenólicos dos três extratos de própolis catarinense testados (Tabela 1). Em virtude disso, temos o menor valor de CC_{50} com essa amostra. Cabe lembrar que a citotoxicidade é uma atividade biológica muito comum entre amostras de própolis de diversas regiões do território brasileiro (FERNANDES-SILVA et al., 2013). Com base nos resultados de CC_{50} supracitados, fica demonstrado a atividade citotóxica do extrato de própolis outonal sendo que as concentrações entre 100 - 200 $\mu\text{g/ml}$ foram as selecionadas para os demais ensaios *in vitro*.

A partir da evidência de que o extrato de própolis outonal entre 100 e 200 $\mu\text{g/ml}$ promove mudanças na viabilidade de HUVECs, a etapa seguinte consistiu em avaliar o efeito do extrato no mecanismo de

proliferação celular. Para isso foram testados os valores entre 100 e 180 $\mu\text{g/ml}$ em 72 h de exposição. Com 180 $\mu\text{g/ml}$ de extrato hidroalcoólico de própolis ocorreu uma diminuição de aproximadamente 50% do número de HUVEC em proliferação, conforme verificado pelo número de células imunorreativas ao BrdU. Também quando administrada em associação com o VEGF exógeno (50 ng/ml), o extrato de própolis sob estudo (150 – 180 $\mu\text{g/ml}$, $p < 0,001$) reverteu o efeito deste fator pró-angiogênico nas células endoteliais, que inclui igualmente a permeabilidade, a proliferação, a migração e a sobrevivência das células, induzindo angiogênese (MAHARAJ; D'AMORE, 2007).

Uma vez que é conhecida a ação do composto AINE, indometacina, na atividade proliferativa de células endoteliais (PEARCE et al., 2003), ele foi utilizado nas HUVECs (1 mM) como um controle positivo dessa atividade. A inibição causada pelo extrato de própolis (180 $\mu\text{g/ml}$) foi similar ao nível de inibição da proliferação celular promovida pela indometacina (Gráfico 4).

De acordo com Izuta et al., (2009) o extrato etanólico de própolis chinesa vermelha suprimiu a proliferação de HUVEC induzida por VEGF com 3 $\mu\text{g/ml}$. Além disso, os autores utilizaram também a riboxistaurina, um inibidor de PKC- β , o qual também mostrou supressão da proliferação. Contudo, Chikaraishi et al., (2010) mostraram a ocorrência de uma redução na proliferação celular apenas com as concentrações de 30 e 100 $\mu\text{g/ml}$ de extrato aquoso de própolis verde brasileira.

É importante destacar o fato de que os valores empregados nos tratamentos do presente estudo contrastam claramente com os

encontrados na literatura no que diz respeito ao uso de HUVECs e exposição à própolis. Porém, valores similares aos utilizados nesse estudo são encontrados quando se estuda o efeito da própolis outras linhagens celulares, como é o caso de Motomura et al., (2008) no qual a atividade proliferativa de células leucêmicas humanas (U937) foi suprimida apenas com concentrações acima de 100 µg/ml de extrato de própolis. Da mesma forma, quando Dota et al. (2010) investigaram a ação do extrato etanólico de própolis na *Candida albicans*, as concentrações efetivas para a inibição das leveduras foram igualmente elevadas, sendo em torno de 550,3 e 1.100,63 µg/ml. Logo, sugere-se que as diferentes concentrações utilizadas nos referidos estudos devem-se não somente às diferentes células e microorganismos utilizados, mas também às diferentes concentrações de extratos de própolis administrados e incluindo-se ainda os respectivos métodos de extração.

É importante comentar que os resultados do presente estudo mostram que o VEGF, um indutor específico de crescimento vascular, não exerceu nenhum efeito protetor no que se refere à ação do extrato de própolis *in vitro*. Contudo, esse é um efeito não esperado, principalmente no organismo vivo, uma que ele tem a função de ser "protetor celular" para injúrias em geral. Neste estudo, esse efeito protetivo não foi visualizado em nenhum ensaio, pois em todas as cavidades onde as células foram co-administradas com extrato de própolis outonal e VEGF, observou-se um efeito reversor do efeito proliferativo deste fator de crescimento nas HUVEC.

Por conseguinte, para determinar se os efeitos inibitórios da própolis outonal evidenciados sobre a proliferação celular seriam

também encontrados no mecanismo de migração, foi realizado o ensaio de formação de cicatriz (*wound-healing assay*). Em todas as concentrações (100 - 180 µg/ml), o extrato de própolis bloqueou a migração unidirecional de HUVEC em comparação à cultura controle, sendo mais expressiva estatisticamente essa diminuição com 180 µg/ml de extrato. Efeito inibitório similar sobre a migração foi visualizado com o tratamento com o inibidor não-seletivo de COX, indometacina (1 mM), administrada sobre as células endoteliais ($p < 0,001$). De fato, estudos prévios demonstraram que a angiogênese foi inibida pela indometacina e por inibidores da COX-2 (AMANO et al., 2002) sugerindo que a isoforma COX-2 regula a ativação de células endoteliais pelo aumento da produção de VEGF (WANG; DUBOIS, 2004).

Nossos resultados são corroborados pelo estudo de Chikaraishi et al., (2010) que mostrou, utilizando extrato aquoso de própolis verde brasileira, redução na migração celular com o tratamento empregando concentrações de 10, 30 e 100 µg/ml. Da mesma forma, estão de acordo com os resultados de Daleprane et al., (2012) referente a uma redução de 68% na migração de células endoteliais promovida por 10 mg/L de fração polifenólica de extrato de própolis vermelha. Adicionalmente, Izuta et al., (2009) obtiveram uma redução do número de células migradas, induzidas pelo VEGF, embora com 3 µg/ml de extrato etanólico de própolis chinesa vermelha.

Uma vez que o extrato de própolis outonal catarinense em estudo evidencia ações anti-migratórias, pode-se sugerir que ele atue

diretamente na regulação do citoesqueleto celular da HUVEC estimulando esse mecanismo.

O próximo ensaio foi realizado com o objetivo de avaliar a atividade da própolis outonal sobre a capacidade das células endoteliais em formar estruturas semelhantes a tubos (tubulogênese). Para isso, realizou-se o ensaio de formação de tubos em Matrigel[®]. Durante a tubulogênese normal, as células endoteliais proliferam, migram e se unem umas às outras para então tornar-se alongadas e formar uma rede. Nas culturas tratadas com 150 e 200 µg/ml de extrato de própolis ocorreu a inibição do processo de tubulogênese pela diminuição da frequência de surgimento de estruturas com aspecto de microtubos no substrato de Matrigel[®] (Fig. 24 B). Os resultados obtidos no presente estudo estão de acordo com os dados encontrados na literatura em abordagens similares. Por exemplo, Kunimasa et al., (2009) estudaram o extrato etanólico de própolis brasileira, relatando substanciais efeitos inibitórios na angiogênese *in vitro*. O comprimento e a largura dos tubos sofreram redução de forma dose-dependente sendo 25 µg/ml a maior concentração efetiva utilizada no estudo. Em outro estudo prévio, Ohta et al., (2008), com uma amostra de própolis adquirida comercialmente (Sigma), inibiu a tubulogênese pelas HUVECs de forma dose-dependente, tendo ocorrido ligeira redução no comprimento dos tubos e uma inibição completa do alongamento destes com 12,5 e 50 µg/ml, respectivamente. Os autores comentam, ainda, que essa inibição foi acompanhada por uma fragmentação parcial de células endoteliais, um indicativo de indução de morte celular. Em contrapartida, na investigação realizada por Ahn et al., (2007), um extrato etanólico de

Os mecanismos inibitórios obtidos com o extrato hidroalcoólico de própolis sobre a proliferação celular endotelial, bem como na migração e na tubulogênese necessitam ainda ser esclarecidos para um melhor entendimento da sua ação nas células formadoras de vasos. Uma vez que existe um crescente interesse em compostos que possam vir a ser utilizados no desenvolvimento de fármacos para o tratamento de distúrbios envolvendo processos de formação de vasos sanguíneos (doenças angiogênicas) como, por exemplo, em algumas condições inflamatórias e tumorais (CRISTOFANILLI et al., 2002; GOODWIN, 2007; AFZAL et al., 2007; ELLIS; HICKLIN, 2008; MOURA et al., 2009). Como demonstrado pelos ensaios realizados até o momento, nesse microambiente endotelial a própolis exerce atividade antiangiogênica, provavelmente, através da modulação de vias de sinalização que ainda precisam ser elucidadas.

Pesquisadores no campo de investigação da angiogênese (KUNIMASA et al., 2009; CHIKARAISHI et al., 2010) vêm buscando identificar os mecanismos moleculares que norteiam o efeito antiangiogênico da própolis. Nesse contexto, com o objetivo de esclarecer um possível mecanismo de ação do extrato de própolis outonal, o próximo ensaio empregou um inibidor (GF109203X) e um ativador (PDBu) da PKC. Sabe-se que a PKC é uma enzima-chave na transdução de sinal sobre a membrana celular e na indução do crescimento celular (IGURA et al., 2001). Esses inibidores e ativadores foram testados em experimentos de proliferação celular pelo método do BrdU, de forma isolada ou em coadministração com o extrato de própolis (200 µg/ml). Os resultados exibiram uma diminuição da

atividade proliferativa de 96% e 94,7% com a exposição ao inibidor e ativador da PKC, respectivamente, quando ambos os reagentes foram administrados conjuntamente com 200 µg/ml de extrato de própolis (Gráfico 9). Dias et al. (2008a), ao utilizar o PDBu (10 µM/disco) na MVA, demonstrou diminuição de 44% do percentual de vasos em comparação ao controle. Nesse estudo, aqueles autores também coadministraram PDBu e GF109203X encontrando uma diminuição significativa de 10,5% de vasos vitelínicos. Evidências apontam para uma diminuição da expressão da PKC induzida pelo PDBu também no ensaio da MCA. Uma vez que a permeabilidade na MCA relacionada com a sinalização do VEGF (WU et al., 1999), DeFouw e DeFouw (2001), diferenciaram propriedades de barreira do endotélio angiogênico, ao utilizar o PDBu na MCA de embriões de *G. domesticus* de 5 dias de incubação (E5), caracterizando o fato de que a PKC contribui em parte na hiperpermeabilidade endotelial.

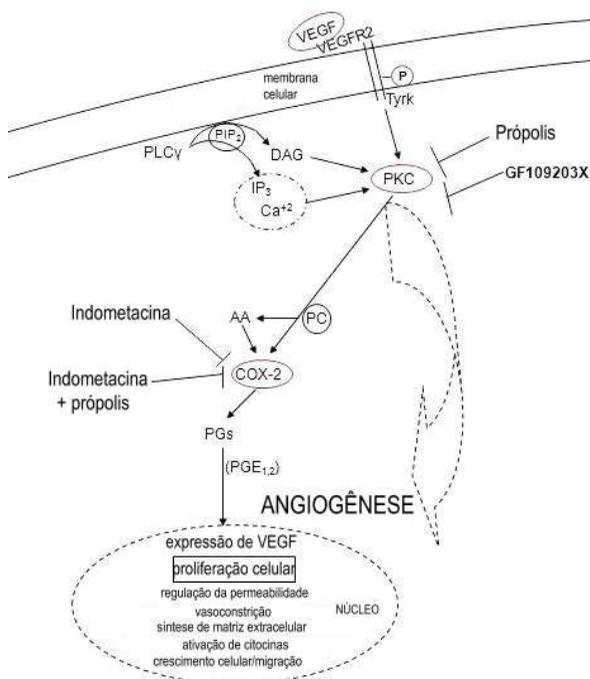
Conforme o exposto, pode-se sugerir uma ação inibitória do extrato de própolis outonal na atividade enzimática da PKC no mecanismo de proliferação (Figura 29). Apesar disso, não há nenhum estudo na literatura que relacione a própolis com a inibição dessa proteína no referido mecanismo. Entretanto, a inibição da ativação da PKC pela quercetina, um flavonóide também encontrado em amostras de própolis (inclusive na amostra sob estudo) também já foi evidenciada em outros trabalhos (IGURA et al., 2001; KEMPURAJ et al., 2005; ROMERO et al., 2009; PRATHEEHSKUMAR et al., 2012).

Pelo fato de ter sido previamente empregada como um controle positivo (Gráfico 4 e 5), a indometacina foi novamente utilizada agora

em coadministração com o extrato de própolis (200 µg/ml, Gráfico 9). De forma isolada ou coadministrada, a indometacina promoveu expressiva redução da atividade proliferativa (82% e 94,7%, respectivamente), sugerindo um efeito bloqueador da própolis juntamente com o inibidor não-seletivo da COX. De fato, a mesma atividade da indometacina sobre a COX foi previamente demonstrada por Wang e DuBois (2004), os quais sugerem um mecanismo pelo qual a isoforma COX-2 regula a ativação de células endoteliais (*switch* angiogênico) pelo aumento da produção (*up*-regulação) de VEGF. Além disso, Dias et al., (2008a) haviam mostrado a ocorrência de regressão vascular (morte endotelial) na MVA de embrião de galinha sob ação de indometacina (500 µM/embrião). Neste contexto, é também digno de nota que Rossi et al. (2002) demonstraram, em um estudo realizado com tecido pulmonar de rato, que o extrato etanólico de própolis (Itália) inibiu, de forma dose-dependente, a atividade da COX. Da mesma forma, em um estudo realizado por Mirzoeva e Calder (1996), o extrato etanólico de própolis suprimiu a geração dos produtos da COX (inibição da enzima) em modelo *in vitro* de macrófagos peritoneais de rato durante a inflamação aguda *in vivo*. De acordo com os autores, isso indica a presença de inibidores da COX na própolis, uma vez que esse efeito da própolis pode ser devido ao grande número de flavonóides encontrados no extrato, os quais têm sido associados à inibição da COX-2, com vários graus de inibição dependendo da sua estrutura e polaridade. De acordo ainda com os autores, o flavonóide quercetina (3,5,7,3',4'-pentahidroxi-flavona), em altas concentrações, bloqueia a via da COX diminuindo a produção de prostaglandina E₂. Tais evidências

conferem suporte para os achados do presente estudo relacionados à atividade inibitória do extrato de própolis outonal, e demonstram a importância da utilização da indometacina nesta investigação. Com base em nossos resultados, é possível sugerir que o extrato sob estudo exerce ação aditiva na inibição da atividade enzimática da COX1/2 promovida pela indometacina (Figura 29).

Figura 29 - Esquema da ação da própolis na sinalização da HUVEC



Vias de sinalização endotelial relacionadas aos efeitos inibitórios do extrato de própolis outonal na ação antiangiogênica do mecanismo proliferativo mediado pela PKC e COX. A ligação do VEGF em seu receptor (VEGFR2) ativa uma grande número de vias de sinalização. A ativação de PLC promove a hidrólise de PIP₂ para IP₃ e DAG levando à liberação de Ca²⁺ e ativação de PKC. Vias de transdução de sinal mediadas por PKC e COX-2 podem levar a inúmeras respostas biológicas como proliferação e outros mecanismos. (AA) Ácido aracônico; (PC) Fosfatidicolina; (PGs) Prostaglandinas; (PGE_{1,2}) Prostaglandina E₁ and E₂.

A quercetina é um flavonóide encontrado em vários alimentos como cebola, maçã, brócolis, alcaparras, salsa, uvas, dentre outros. Os flavonóides são substâncias polifenólicas que são encontradas na maioria das plantas utilizadas como alimento e possuem efeitos antivirais, antimicrobianos, antialérgico, antitrombótico, antimutagênico e antineoplásico em diferentes tipos celulares e em modelos animais e humanos (PRATHEESHKUMAR et al., 2012). A quercetina está em destaque entre os flavonóides encontrados na amostra de própolis sob estudo. É o flavonóide mais comum na natureza, com numerosas atividades biológicas descritas, incluindo efeitos antiinflamatórios e antioxidantes (NIJVELDT et al., 2001; AHN et al., 2009).

É importante comentar que uma variedade de compostos fenólicos, incluindo flavonóides e ácidos fenólicos além de derivados do ácido caféico, são geralmente encontrados em muitos tipos de própolis. Por outro lado, outras substâncias são específicas para um determinado tipo de própolis, como éster feniletílico do ácido cafeico (CAPE), comumente presente na própolis europeia e a artepilina C, um biomarcador exclusivo conhecido da própolis verde brasileira (HORI et al., 2013). Contudo, ambas as substâncias não foram localizadas no extrato de própolis outonal em estudo, até o momento.

A partir dos achados ilustrados na Tabela 2, parece que a quercetina surge como um composto importante nas ações antiangiogênicas. Devido a esses achados, a próxima pergunta da pesquisa foi se o composto puro quercetina, um flavonóide encontrando em grande quantidade na amostra sob estudo (144, 24 µg/ml), exerceria efeitos similares aos do extrato de própolis sobre as HUVECs? Para

responder a esse novo questionamento, novos ensaios de proliferação celular foram executados. Os dados mostraram que a quercetina (40 μM) promoveu substancial diminuição da atividade proliferativa de forma isolada ou mesmo coadministrada com o extrato de própolis. Os resultados do presente estudo concordam com os dados existentes na literatura quanto à inibição do processo proliferativo pela administração do flavonóide quercetina sobre a linhagem HUVEC. Contudo, vale destacar que os outros compostos identificados na própolis outonal, o qual também podem ser compostos bioativos, podem estar mostrando ações sinérgicas juntamente com a quercetina para a promoção do efeito antiproliferativo evidenciado no presente estudo.

Ahn et al. (2009) mostraram que a quercetina inibe a proliferação de HUVECs em 36%, bem como inibe fortemente a tubulogênese de forma dose-dependente. Da mesma forma, Tan et al. (2003) relatam que a quercetina promove inibição em diversas etapas da angiogênese incluindo proliferação, migração e tubulogênese nas linhagens HDMEC e HUVEC. De acordo com Kempuraj et al. (2005), a quercetina pode estar atuando através da inibição da liberação de fatores pró-angiogênicos o qual envolve a inibição da PKC. Zhang, Huang e Xu (2004), ao utilizarem um ativador de PKC, observaram um antagonismo da ação inibitória induzida pela quercetina, levando os autores a concluir que a quercetina exerce efeitos modulatórios sobre a PKC. Em outro estudo, o tratamento com quercetina (40 μM) reduziu a fosforilação da Akt nas HUVECs, mantendo, contudo, a quantidade total dessa proteína, inalterada (PRATHEESHKUMAR et al., 2012). Além disso, Igura et al. (2001) mostraram que a quercetina inibiu o

crescimento (6-100 μM) e a migração (25-100 μM) de BAECs de forma dose-dependente. Nesse mesmo estudo, a quercetina, nas concentrações acima de 100 μM , inibiu significativamente a tubulogênese.

A despeito das evidências consideradas no parágrafo anterior, os efeitos da quercetina na formação de vasos sanguíneos parecem ser ainda alvos de discussão. Por exemplo, o estudo de Jeon et al. (2007) tem mostrado os efeitos pró-angiogênicos deste flavonóide, o qual, segundo aqueles autores, estaria suprarregulando o VEGF em células epiteliais de cólon em modelo de inflamação. De acordo com o estudo, ainda, as células epiteliais do cólon estimuladas com VEGF e tratadas com quercetina, realizaram tubulogênese e a indução observada mostrou ser dependente da ativação do HIF-1.

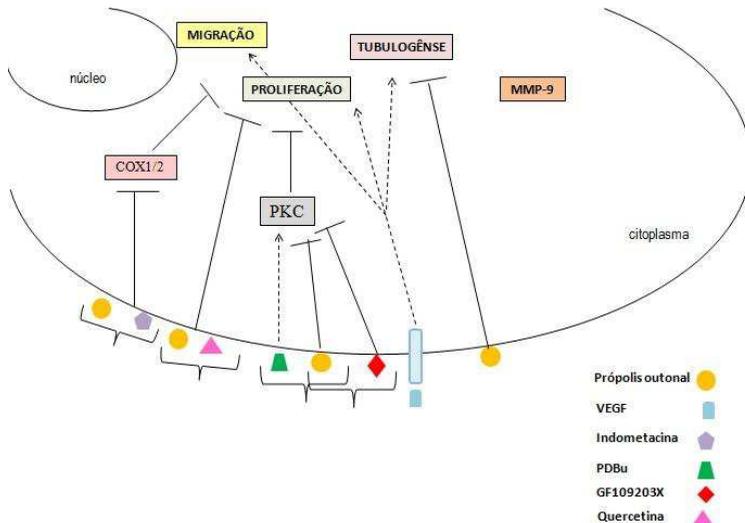
Embora os compostos ativos da própolis ainda estejam sob discussão, um número elevado de efeitos biológicos são atribuídos a componentes específicos (HORI et al., 2013). Dentre os componentes específicos mais estudados da própolis estão o CAPE e a artepilina C. A partir dos resultados encontrados com a quercetina, é possível sugerir que este flavonóide possa vir a ser útil no desenvolvimento de agentes terapêuticos ou fatores nutricionais profiláticos com aplicação na terapia de distúrbios angiogênicos.

No início da angiogênese, moléculas presentes na matriz extracelular, tais como as metaloproteinases, são enzimas cruciais nesse processo pelo fato de degradarem a membrana basal viabilizando os eventos de migração, proliferação e tubulogênese (ESFAHANIAN et al., 2012). Desta forma, com base nos dados obtidos até o momento na presente investigação, o próximo passo foi avaliar a ação do extrato de

própolis outonal sobre a atividade da MMP-9, a qual está envolvida nos mecanismos relacionados à tubulogênese. Nossos resultados mostraram que essa MMP não sofre influência da ação do extrato de própolis outonal na sua atividade, uma vez que seus níveis não foram alterados (Gráfico 8). No entanto, no estudo de Jin et al., (2005) o CAPE, um composto encontrado em amostras de própolis (10 e 20 $\mu\text{g/ml}$), mostrou ação inibitória sobre a MMP-9. É possível considerar que, uma vez que a supressão de um efeito biológico pode resultar de interações entre compostos de matrizes complexas, como é o caso da própolis, suas atividades farmacológicas podem decorrer do sinergismo entre seus diversos compostos químicos (KROL et al., 1993; MARCUCCI, 1996). Uma hipótese relacionada à MMP-9, uma molécula importante na etapa inicial da angiogênese (degradação da lâmina basal), seria o fato de que o extrato em estudo pode não ser capaz de modular angiogênese em uma etapa tão inicial do processo, devido ao fato de o mesmo não possuir teor de CAPE. Uma hipótese importante é o fato de que o extrato de própolis outonal possa ter ações importantes na atividade de outras MMPs não relacionadas ao processo angiogênico.

A Figura 30 resume as informações referentes à sinalização da PKC, COX e atividade de MMP-9 pela ação do extrato hidroalcoólico de própolis nas HUVECs.

Figura 30 - Possíveis efeitos da própolis na sinalização na célula endotelial



Da esquerda para a direita, ações sugeridas do extrato de própolis em enzimas relacionadas à cascata angiogênica, com ênfase na proliferação de células endoteliais (HUVEC). O inibidor não seletivo da COX1/2 (indometacina), administrado isoladamente tanto quanto em associação (chave) com o extrato de própolis, promoveu um bloqueio da atividade proliferativa de HUVEC. Da mesma forma, a quercetina isolada ou coadministrada (chave) com o extrato promoveu diminuição da proliferação de HUVEC. A própolis coadministrada com o PDBu (chave) reverteu o efeito estimulador da PKC exercido pelo PDBu isoladamente. Na coadministração de própolis com GF109203X (chave), predominou o efeito inibitório da PKC, o qual diminuiu a atividade proliferativa. Nenhum efeito foi verificado na atividade da MMP-9. A ativação e inibição da atividade são representadas pelos símbolos (-----) e (⊣), respectivamente.

Desta forma, ao se verificar a diminuição do mecanismo proliferativo pela HUVEC com o uso do ativador da PKC, surgiu uma nova pergunta nesta pesquisa: a redução do número de HUVEC pelo extrato de própolis, nos ensaios realizados até o momento, é devido especificamente a atividade antiproliferativa decorrente da inibição da

PKC ou também pela ocorrência de eventos de morte celular? Para responder a essa questão, é importante determinar o tipo de morte celular que ocorre quando as células são expostas ao extrato sob estudo.

De acordo com os dados de citometria de fluxo apresentados na Tabela 5 e Gráfico 7, os valores mais elevados de morte celular foram de 33,5% de células necróticas e de 22% de células apoptóticas, ao se combinar extrato de própolis e o inibidor de ERK1/2 (U0126); os percentuais de 16,5% e 23% de células em apoptose e necrose, respectivamente, foram obtidos com 180 µg/ml de extrato de própolis. Portanto, não foi possível observar valores expressivos de morte celular, sugerindo que a diminuição de células vivas na população de HUVECs nos grupos expostos ao extrato pode ser devido, em maior parte, à ação inibitória da PKC do que em relação aos eventos indutores de morte celular.

De acordo com o estudo realizado por Orsolich et al. (2004), foi mostrado um leve aumento (0,56%) no percentual de células apoptóticas de carcinoma mamário após 3 horas de incubação e de 6,02% após 15 horas de incubação com um extrato de própolis (50 µg/ml). Nos mesmos períodos de tempos de tratamento, os autores observaram também um aumento significativo no nível de células em necrose. Os autores sugeriram que a baixa indução do efeito apoptótico sobre as células pode ser resultado da complexidade do extrato, ou seja, o grande número de componentes que ele apresenta poderia gerar um efeito antagônico. Em outro estudo de Scifo et al. (2004), o resveratrol, bem como o extrato etanólico de própolis, causaram necrose e apoptose em células humanas de câncer de próstata, respectivamente. Fato

interessante é que os autores observaram que ao aumentar a concentração de resveratrol nas culturas (200 μ M), um comportamento diferente desta molécula foi observado, pois o tipo de morte celular induzida parece ter mudado da apoptose para a necrose. Em um outro estudo, realizado por Lee et al. (2013), foi demonstrado que um novo derivado da quercetina - quercetina-3-O-(2 galoil)-a-raminopiranosídeo - inibe a ativação das vias de sinalização ERK e NF- κ B em queratinócitos humanos.

É bem conhecido na literatura que elevados níveis de flavonóides e compostos fenólicos totais já mostraram exercer também uma potente atividade antioxidante (AHN et al., 2009). De fato, a formação de vasos sanguíneos, foco do presente estudo, é um processo onde o estresse oxidativo pode ocorrer em alguma extensão, principalmente em doenças angiogênicas (ex.: câncer e retinopatia diabética). A redução do dano celular por espécies reativas de oxigênio (EROs) via ação de compostos químicos eliminadores, i.e., compostos fenólicos, é reconhecida como sendo de grande importância terapêutica (DONG et al., 2007). Entretanto, para Ahn et al. (2009), o papel de EROs na angiogênese necessita ser criteriosamente avaliado.

Evidências sugerem que compostos fenólicos podem atuar por meio de outros mecanismos além da capacidade antioxidante, como a modulação da atividade de enzimas telomerase, lipoxigenase, COX, entre outras, assim como por interações com receptores e vias de transdução de sinais, regulação do ciclo celular, entre outros mecanismos essenciais para a manutenção da homeostase dos organismos vivos (OLIVEIRA; BASTOS, 2011).

De acordo com Norrby (2006), quando se propõe estudar a ação de um determinado composto na angiogênese, devem-se utilizar metodologias também *in vivo* de forma a confirmar as respostas obtidas nos ensaios *in vitro*. Portanto, em decorrência disso e também com o presente panorama de dados obtidos nesse estudo, empregaram-se os ensaios das membranas vitelínica e corioalantóica de embriões de *Gallus domesticus*.

O ensaio da MVA foi realizado para determinar se o extrato hidroalcoólico de própolis influenciaria a formação de vasos sanguíneos primordiais (vasos primários). Em seguida foi realizado o ensaio da MCA para determinar se a própolis influenciaria a formação de vasos a partir de vasos sanguíneos pré-existentes. Verificou-se que a própolis (450 mg/kg por embrião ou 0,0189 mg por disco) inibiu de um modo estatisticamente significativo a formação dessas estruturas no ensaio da MVA, de 4 dias e no ensaio da MCA, de 8 dias. Esses dados corroboram os resultados dos ensaios *in vitro* descritos anteriormente nesse estudo.

Song et al. (2002) demonstraram com o extrato etanólico de própolis (5 µg/ovo), a presença de zonas avasculares na MCA. Para Tsuchiya et al. (2013) o extrato etanólico de própolis de Okinawa (Japão) mostrou significativa atividade antiangiogênica no ensaio da MCA com 25 µg/ovo. No estudo realizado por Tan et al. (2003), foi verificado com o mesmo ensaio, importante supressão na vascularização da MCA promovida por quercetina (50 ou 100 nmol/10µl/ovo). Naquele estudo, apenas as concentrações abaixo de 25 nmol não mostraram efeito inibitório na MCA. Uma vez que os vasos sanguíneos encontram-se envolvidos por outros tecidos conjuntivos extra-

embrionários, foi necessário utilizar concentrações do extrato de própolis relativamente elevadas nos ensaios *in vivo*.

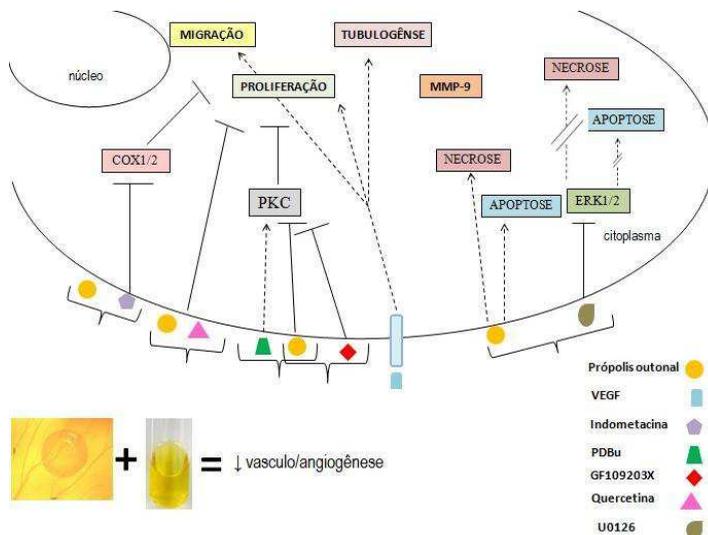
Por outro lado, em relação a ambos os modelos *in vivo*, diferentemente do ensaio da MCA o qual é talvez o modelo *in vivo* mais usado para o estudo da angiogênese (VU et al., 1985; SONG et al., 2002), o ensaio da MVA realizado no presente estudo é um método viável para diferenciar microvasos recém-formados daqueles vasos vitelínicos primários já presentes no segundo dia de desenvolvimento do embrião. Vale lembrar que a remodelagem subsequente da rede vascular recém-formada dá origem a uma microvasculatura mais organizada (FOLKMAN, 1971). Além disso, no segundo dia de vida embrionária, próximo do local em que se encontra o embrião, ainda há a presença de ilhotas sanguíneas, evidenciando a ocorrência do processo de vasculogênese. No presente estudo foi possível notar uma diminuição significativa na densidade vascular na MVA, desencadeada por doses eficazes de própolis, indicando, portanto, que nenhum novo microvaso estava presente. Esses dados *in vivo* conferem suporte aos resultados *in vitro*.

Em ambos os microambientes - placa de cultura e anexos embrionários - um efeito modulatório na população de células/microvasos foi constatado. Ressalta-se ainda que o embrião é um sistema vivo e em desenvolvimento, no qual há a presença de diversos fatores reguladores como interleucinas, fatores de crescimento, citocinas, que poderiam estar atuando na prevenção ou na compensação do efeito antiangiogênico do extrato de própolis. Apesar disso, como

demonstrado neste estudo, efeitos inibidores na formação de vasos foram evidenciados.

A Figura 31 apresenta um resumo esquemático de todos os resultados *in vitro* e *in vivo* que compõem a presente tese.

Figura 31 - Resumo esquemático da tese



Resumo dos dados encontrados a partir dos ensaios na presente tese. Da esquerda para a direita, ações sugeridas do extrato de própolis em enzimas relacionadas à cascata angiogênica, com ênfase na proliferação de células endoteliais (HUVEC). O inibidor não seletivo da COX1/2 (indometacina), administrado tanto isoladamente quanto em associação (chave) com extrato de própolis, promoveu um bloqueio da atividade proliferativa de HUVEC. Da mesma forma, a quercetina isolada ou coadministrada (chave) com o extrato promoveu diminuição da proliferação de HUVEC. A própolis coadministrada com o PDBu (chave) reverteu o efeito estimulador da PKC exercido pelo PDBu isoladamente. Na coadministração de própolis com GF109203X (chave), predominou o efeito inibitório da PKC, o qual diminuiu a atividade proliferativa. Nenhum efeito foi verificado na atividade da MMP-9. O extrato de própolis promoveu redução da atividade dos mecanismos de proliferação, migração e tubulogênese. Além de uma tendência a uma ação pró-necrótica principalmente quando combinada com a ação inibitória da ERK1/2. O extrato de própolis diminuiu a vasculogênese e a angiogênese de embriões de *Gallus*

domesticus (fotografias). A ativação e inibição da atividade são representadas pelos símbolos (----->) e (⊥), respectivamente. A flecha contendo dois traços perpendiculares (----/ /----->) representa ação indireta.

A pesquisa com própolis é ainda um campo emergente nos estudos de produtos naturais. Muito trabalho resta a ser feito sobre os tipos de própolis, seus constituintes e suas atividades biológicas e isso continuará a fornecer novas substâncias naturais para a composição de novos fármacos (SALATINO et al., 2011). É bastante conhecido que determinados compostos da própolis como ácidos fenólicos, flavonóides, esteróides e terpenos exercem relevantes efeitos biológicos alterando o comportamento celular (SILVA et al., 2007; MARTOS et al., 2008; DALEPRANE et al., 2012).

O flavonóide quercetina e os ácidos fenólicos identificados no extrato de própolis sob estudo (ácido gálico, ácido protocatecuico e ácido clorogênico) podem estar atuando sinergicamente para o efeito antagônico sobre a atividade da PKC e COX, levando à diminuição do mecanismo proliferativo, migratório e tubulogênico, sem contudo influenciar na atividade da MMP-9. Portanto, sugere-se que a atividade antiangiogênica do extrato hidroalcoólico de própolis outonal seja o resultado de atividades sinérgicas dos compostos identificados na composição do extrato, em maior ou menor quantidade, pois, de acordo com Hori et al. (2013), os produtos naturais podem apresentar um efeito sinérgico resultante da combinação de seus compostos. De acordo com os dados do presente estudo, é possível sugerir um efeito promissor com o uso do extrato completo e não somente do composto isolado, uma vez que Marcucci (1996) relata que observou-se um sinergismo entre os muitos constituintes da própolis quando no estudo de várias frações de

um extrato etanólico de própolis. Nesse estudo, nenhuma fração separada inibiu o crescimento do *Staphylococcus aureus*. Quando todas as frações foram reunidas, recuperou-se a atividade total do extrato etanólico de própolis. De acordo com Marcucci (1996), esses resultados indicam que o potencial antibacteriano da própolis não é devido à presença de uma substância em particular, mas resultante de uma ação complexa de vários compostos.

De fato, a sub-regulação (*downregulation*) dos mecanismos desencadeadores da cascata angiogênica, presente em uma condição patológica ou fisiológica, constitui um dos parâmetros a ser alcançados nos tratamentos clínicos. Modulações na sinalização celular que resultem em alterações de mecanismos endoteliais, como sobrevivência e proliferação, são possíveis metas dos processos terapêuticos. Para que o extrato de própolis outonal exerça essas ações moduladoras nas HUVECs durante a proliferação, a migração e a tubulogênese *in vitro*, bem como na atividade anti-vasculo/angiogênica *in vivo*, é necessário que ele module a via que sinaliza esses mecanismos. A inibição da PKC, uma proteína envolvida na via de sinalização da proliferação celular, pode ser o principal fator desencadeador dessa resposta, bem como o bloqueio de enzimas envolvidas em processos inflamatórios, como a COX-2, podem contribuir para a sub-regulação nesse microambiente. Contudo, eventos indutores de morte celular não devem ser descartados deste contexto. Além disso um conjunto de outras proteínas envolvidas na sinalização de sobrevivência, proliferação e migração podem estar sofrendo um bloqueio similar. Dentre elas podemos sugerir a MAPK, ERK, Akt e PIK3, além de diversos fatores de crescimento como o

FGFb, o TGF- β e citocinas. Dentre todas as possíveis inter-relações das enzimas em estudo, por exemplo a PKC, é possível sugerir que esta poderia estar regulando outras vias, influenciando a expressão de VEGF, ou a atividade de outras enzimas nas HUVECs, tais como a COX.

O conhecimento a respeito da qualidade e efeitos biológicos de um extrato a ser estudado é primordial antes de iniciar os ensaios mais avançados da investigação, como é o caso dos ensaios clínicos. Para isso, é necessária uma gama de dados com base em dose-resposta para que ele possa vir a ser no futuro utilizado na terapêutica de doenças angioproliferativas. As modificações da resposta biológica obtida pelo extrato podem aumentar potencialmente as terapias convencionais de diversas patologias. A combinação de uma determinada terapia com compostos antiangiogênicos pode ser eficaz na proliferação celular endotelial descontrolada.

De acordo com a primeira hipótese do presente estudo, foi proposto que o extrato hidroalcoólico de própolis poderia alterar a função da célula endotelial através da regulação dos processos que controlam o crescimento vascular. Esta hipótese pode ser confirmada nos resultados dos primeiros ensaios *in vitro*. Nestes foi demonstrado que a própolis promoveu diminuição na atividade proliferativa, bem como no comportamento migratório e na formação de estruturas semelhantes a capilares (tubulogênese). Além disso, esses dados foram confirmados com ensaios *in vivo* de formação de vasos sanguíneos nas membranas extra-embriônicas.

A segunda hipótese do trabalho foi baseada no mecanismo de sinalização pelo qual a própolis poderia estar exercendo a sua atividade

moduladora. Hipotetizou-se que ela influenciaria a atividade de determinadas proteínas envolvidas nas vias de angiogênese. Nos ensaios *in vitro* complementares foi possível constatar essa modulação na atividade da PKC, bem como um efeito aditivo do extrato de própolis outonal associado com indometacina na ação da COX. Tal efeito modulatório não se verificou sobre a atividade da MMP-9.

A quercetina emerge neste estudo como um composto importante nos efeitos anti-vasculo/angiogênicos da administração de própolis. Uma vez que o efeito antiproliferativo da quercetina isoladamente foi observado na mesma intensidade que o apresentado pelo extrato de própolis. Esses resultados sugerem que a própolis coletada no sul do Brasil (exibindo altos níveis de flavonóides e ácidos fenólicos) é capaz de inibir determinadas funções endoteliais em mais de um processo de formação vascular. Estas ações da própolis suportam a hipótese de que sua constituição quimicamente complexa pode ser um instrumento no qual aspectos modulatórios do crescimento de novos vasos sanguíneos são comprometidos. Desta forma ela pode ser uma ferramenta útil para a terapia de doenças crônicas nas quais a angiogênese sustentada contribui para a sua gênese.

Por fim, quanto à originalidade da presente tese, cabe lembrar que o tipo de própolis escolhida para esta investigação (produzida na região do planalto catarinense) não possuía nenhum dado prévio na literatura científica com relação ao seu perfil fitoquímico e, especialmente, em relação às atividades biológicas relacionadas à angiogênese. A partir do corpo de evidências deste estudo, foi possível a divulgação de dados de composição química e ações antiangiogênicas (MENEGHELLI et al.,

2013). Quanto à contribuição para a área de estudo, foi evidenciado o fato de que o extrato hidroalcoólico de própolis outonal catarinense promove efeitos anti-vasculo/angiogênicos ao modular a proliferação, a migração e formação de vasos sanguíneos, modulação esta decorrente da inibição de proteínas envolvidas na cascata de ativação angiogênica.

6 CONCLUSÕES

O presente estudo possibilitou enumerar as seguintes conclusões:

- 1) Os compostos majoritários identificados no extrato de própolis investigado, coletado no outono em São Joaquim/SC (2010), são o flavonóide quercetina e os ácidos fenólicos: ácido gálico, ácido protocatecuico e ácido clorogênico e seus ésteres derivados como o ácido isoclorogênico A e o ácido isoclorogênico C. Quantidades menores ($< 1,8 \mu\text{g/ml}$) de ácido p-cumárico, ácido siríngico, ácido vanílico, ácido cafeico, ácido ferúlico e rutina foram também detectados.
- 2) O extrato hidroalcoólico de própolis reduziu significativamente a viabilidade das células da linhagem HUVEC (24 e 72 h). O intervalo de concentração efetiva do extrato foi observado entre 100 e 200 $\mu\text{g/ml}$ sendo a amostra outonal a selecionada para os experimentos *in vitro*, em razão do menor valor de CI_{50} apresentado.
- 3) O extrato hidroalcoólico de própolis outonal diminuiu substancialmente a atividade proliferativa da HUVEC. Além disso, o extrato de própolis reverteu o efeito proliferativo do VEGF nessas células.
- 4) O extrato de própolis inibiu a migração unidirecional de HUVEC. Nível similar de inibição ocorreu quando a atividade da enzima pró-inflamatória COX1/2 foi bloqueada pela indometacina. Este inibidor de migração celular, um importante

mecanismo de angiogênese, evidencia a efetividade do extrato nesse ensaio.

- 5) O tratamento com o extrato hidroalcoólico de própolis também inibiu fortemente a atividade tubulogênica de HUVEC.
- 6) Eventos de morte celular em HUVEC foram observados após a administração do extrato, revelando uma tendência à ação pró-necrótica. O efeito do extrato isoladamente, foi aumentado com a associação ao inibidor da ERK1/2 (U0126).
- 7) O extrato de própolis inibiu a atividade sinalizadora da PKC uma vez que diminuiu os eventos de proliferação celular. Além disso, o extrato causou efeito aditivo na inibição desencadeada pela indometacina sobre a COX contribuindo, dessa forma, para a redução da atividade proliferativa.
- 8) A exposição ao extrato de própolis não alterou a atividade da MMP-9 sugerindo que essa enzima não sofre modulação pelos constituintes químicos da amostra de própolis estudada.
- 9) A quercetina administrada isoladamente tanto quanto em associação com o extrato de própolis, diminuiu a atividade proliferativa de HUVEC.
- 10) O extrato de própolis foi efetivo na redução da vasculogênese na MVA de embriões de *G. domesticus* nas idades embrionárias de E2-E4 dias.
- 11) O extrato de própolis foi efetivo na redução da angiogênese na MCA de embriões de *G. domesticus* nas idades embrionárias de E6-E8 dias.

Considerados no todo, os achados do presente estudo demonstram que o extrato hidroalcoólico de própolis outonal catarinense inibiu a formação de vasos sanguíneos *in vivo* (vasculogênese e angiogênese). Ainda, conferem suporte a esses achados os efeitos inibitórios promovidos pela própolis nos mecanismos de proliferação, migração e tubulogênese *in vitro*.

O conjunto de resultados apresentados nesta tese representa as primeiras evidências na literatura da inibição da PKC pelo extrato de própolis outonal coletado no planalto catarinense (2010), a qual pode ser uma estratégia terapêutica para o controle da formação vascular em condições patológicas. Acredita-se que esse produto natural beneficiado com uma composição agora quimicamente caracterizada, constitua um componente a ser utilizado na terapêutica da angiogênese excessiva. Constitui, ainda, um candidato para outros estudos farmacológicos e futuros estudos clínicos, na busca de uma terapia efetiva e segura para o controle de distúrbios angiogênicos.

7 PERSPECTIVAS

Esta tese fornece inúmeros subsídios para a continuidade dos estudos com ênfase em atividades biológicas com a própolis catarinense, entre os quais podemos destacar:

- Estudos com ênfase na angiogênese patológica, através do uso de modelos *in vivo*, a exemplo do modelo do saco aéreo subcutâneo no dorso de camundongos infiltrado com células tumorais bem como através de ensaios *in vitro* utilizando linhagens tumorais.
- Aprofundamento da investigação sobre as vias de atividade relacionadas à angiogênese fisiológica complementando com evidências da angiogênese patológica.

REFERÊNCIAS

ADAMS, R.H.; ALITALO, K. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. **Nature Reviews**. 8, 464-478. 2007.

AFZAL, A., SHAW, L.C., LJUBIMOV, A.V., BOULTON, M.E., SEGAL, M.S., GRANT, M.B. Retinal and choroidal microangiopathies: therapeutics opportunities. **Microvasc. Res**. 74, 131-144. 2007.

AHN, M.R.; KUNIMASA, K.; KUMAZAWA, S.; NAKAYAMA, T.; KAJI, K.; UTO, Y.; HORI, H.; NAGASAWA, H.; OHTA, T. Correlation between antiangiogenic activity and antioxidant activity of various components of propolis. **Mol. Nutr. Food Res**. 53: 643-651. 2009.

AHN, M.R.; KUNIMASA, K.; OHTA, T.; KUMAZAWA, S.; KAMIHIRA, M.; KAJI, K.; UTO, Y.; HORI, H.; NAGASAWA, H.; NAKAYAMA, T. Suppression of tumor-induced angiogenesis by Brazilian propolis: Major component artepillin C inhibits in vitro tube formation and endothelial cell proliferation. **Cancer Lett**. 252: 235-43. 2007.

AIRD, W. C. Endothelial Cell Heterogeneity. **Cold Spring Harb Perspect Med**. 2(1): a006429. 2012.

ALENCAR, S. M; OLDONI, T. L. C; CASTRO, M. L; CABRAL, I. S. R; COSTA-NETO, C. M; CURY, J. A; ROSALEN, P.L; IKEGAKI, M. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. **J. Ethnopharmacol**. 113:278-283 2007.

ALVAREZ-GARCIA, V.; GONZÁLEZ, A.; ALONSO-GONZÁLEZ, C.; MARTÍNEZ-CAMPA, C.; COS, S. Antiangiogenic effects of melatonin in endothelial cell cultures. **Microv. Res. (Article in press)**. 2013.

AMANO, H; HAYSAHI, I; YOSHIDA, S; YOSHIMURA, H; MAJIMA, M. Cyclooxygenase-2 and adenylate cyclase/protein kinase

A signaling pathway enhances angiogenesis through induction of vascular endothelial growth factor in rat sponge implants. **Hum Cell.** 15:13-24. 2002.

BANDELLO, F; LATTANZIO, R; ZUCCHIATTI, I; DEL TURCO, C. Pathophysiology and treatment of diabetic retinopathy. **Acta Diabetol.** 50:1-20. 2013.

BANKOVA, V. Chemical diversity of propolis makes it a valuable source of a new biologically active compounds. **J. ApiProduct ApiMedical Sci.** 1(2):23-28. 2009.

BANKOVA, V. S; DE CASTRO, S.L; MARCUCCI, M.C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie.** 31:3-15. 2000.

BANSKOTA, A.H; TEZUKA, Y; ADNYANA, I.K; MIDORIKAWA, K; MTSUSHIGE, K; MESSAGE, D; HUERTAS, A.A.G; KADOTA, S. Cytotoxic, hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, the Netherlands and China. **J. Ethnopharmacol.** 72:239-246. 2000.

BANSKOTA, A.H., TEZUKA, Y., KADOTA, S. Recent progress in pharmacological research of propolis. **Phytother. Res.** 15: 561-571. 2001.

BASINI, G.; BAIONI, L.; BUSSOLATI, S.; GRASSELLI, F.; DAQUINO, C.; SPATAFORA, C.; TRINGALI, C. Antiangiogenic properties of an unusual benzo[k,l]xanthene lignin derived from CAPE (Caffeic acid phenethyl ester). **Invest. New Drugs.** 30: 186-190. 2010.

BERGHE, T.V; VANLANGENAKKER, N; PARTHOENS, E; DECKERS, W; DEVOS, M; FESTJENS, N; GUERIN, C.J; BRUNKS, U.T; DECLERCQ, W; VANDENABEELE, P. Necroptosis, necrosis and secondary necrosis converge on similar cellular disintegration features. **Cell Death Different.** 17, 922-930. 2010.

BIKFALVI, A; KLEIN, S; PINTUCCI, G; RIFKIN, D.B. Biological roles fibroblast growth factor-2. **Endocr. Rev.** 18: 26-45. 1997.

Biozoom. Disponível em: <<http://www.biozooomer.com/2012/11/chick-extra-embryonic-membranes.html>. > Acesso em: 13 junho 2013.

BISCHOFF, J. Approaches to studying cell adhesion molecules in angiogenesis. **Trends in Cell Biology**. 5:69-74. 1995.

BOCK, K., CAUWENBERGHS, S., CARMELIET, P. Vessel abnormalization: another hallmark of cancer? Molecular mechanisms and therapeutic implications. **Curr. Opin. Genet. Dev.** 21:73-79. 2011.

CARMELIET, P. Angiogenesis in health and diseases. **Nature Med.** 9: 653-660. 2003.

CARMELIET, P. Angiogenesis in life, disease and medicine. **Nature**. 438: 932-936. 2005.

CARMELIET, P; JAIN, R.K. Angiogenesis in cancer and other diseases. **Nature**. 407: 249-257. 2000.

CARMELIET, P; MOONS, L; LUTTUN, A; VINCENTI, V; COMPERNOLLE, V; DE MOL, M; WU, Y; BONO, F; DEVY, L; BECK, H; SCHOLZ, D; ACKER, T; DIPALMA, T; DEWERCHIN, M; NOEL, A; STALMANS, I, BARRA, A; BLACHER, S; VANDENDRIESSCHE, T; PONTEN, A; ERIKSSON, U; PLATE, K.H; FOIDART, J.M; SCHAPAER, W; CHARNOCK-JONES, D.S; HICKLIN, D.K; HERBERT, J.M; COLLEN, D; PERSICO, M.G. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. **Nature Med.** 7: 575-83. 2001.

CASTALDO, S., CAPASSO, F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia**. 73 (Supl 1): 1-6. 2002.

CASTRO, S.L. Propolis: biological and pharmacological activities. Therapeutics uses of this bee-product. **Annu. Rev. Biomed. Sci.** 3: 49-83. 2007.

Cell Signaling Technology in Angiogenesis. Disponível em: <
<http://www.cellsignal.com/pathways/angiogenesis.jsp> > Acesso em: 16
set 2012.

CHAABANE, W.; USER, S.D.; EL-GAZZAH, M.; JAKSIK, R.;
SAJJADI, E.; RZESZOWSKA-WOLNY, J.; LOS, M. J. Autophagy,
Apoptosis, Mitoptosis and Necrosis: Interdependence between those
pathways and effects on cancer. **Arch. Immunol. Ther. Exp.** 61: 43-58.
2013.

CHANG, C; WERB, Z. The many faces of metalloproteases: cell
growth, invasion, angiogenesis and metastasis. **Trends Cell Biol.** 11:
37-43. 2001.

CHAPMAN, S.C., COLLIGNON, J., SCHOENWOLF, G.C.,
LUMSDEN, A. Improved method for chick whole-embryo culture using
a filter paper carrier. **Dev. Dyn.** 220: 284–289. 2001.

CHEN, P.L.; EASTON, A.S. Anti-angiogenic effects of resveratrol on
cerebral angiogenesis. **Curr. Neurovasc. Res.** 8:14-24. 2011.

Chickscope. Disponível em:
<http://chickscope.beckman.uiuc.edu/resources/egg_to_chick/development.html. > Acesso em: 13 junho 2013.

CHIKARAISHI, Y.; IZUTA, H.; SHIMAZAWA, M; MISHIMA, S;
HARA. Angiostatic effects of Brazilian green propolis and its chemical
constituents. **Mol. Nutr. Food Res.** 54: 566-575. 2010.

CHUNG, A.S; FERRARA, N. The Extracellular Matrix &
Angiogenesis: Role of the Extracellular Matrix in Developing Vessels
and Tumor Angiogenesis. **ECM & Angiogenesis.** 11. 2010.

CIMPEAN, A.M., RIBATTI, D., RAICA, M. A brief history of
angiogenesis assays. **J. Dev. Biol.** 55: 377-382. 2010.

CLEMENTE, M; SÁNCHEZ-ARCHIDONA, A. R; SARDÓN, D;
DÍEZ, L; MARTÍN-RUIZ, A; CACERES, S; SASSI, F; PÉREZ-
ALENZA, M. D; ILLERA, J.C; DUNNER, S; PEÑA, L.

Different role of COX-2 and angiogenesis in canine inflammatory and non-inflammatory mammary cancer. **The Veterin. J.** 2013. *Article in press.*

COULTAS, L., CHAWENGSAKSOPHAK, K., ROSSANT, J. Endothelial cells and VEGF in vascular development. **Nature.** 438: 937-945. 2005.

CRISTOFANILLI, M., CHARNSANGAVEJ, C., HORTOBAGYI, G.N. Angiogenesis modulation in cancer research: novel clinical approaches. **Nat. Rev. Drug Discov.** 1, 415-426. 2002.

DA SILVA, J.F.M., SOUZA, M.C., MATTA, S.R., ANDRADE, M.R., VIDAL, F.V.N. Correlation analysis between phenolic levels of Brazilian propolis extracts and their antimicrobial and antioxidant activities. **Food Chem.** 99: 431-435. 2006.

DALEPRANE, J.B., SCHMID, T., DEHNE, N., RUDNICKI, M., MENRAD, H., GEIS, T., IKEGAKI, M., ONG, T.P., BRUNE, B., ABDALLA, D. S. P. Suppression of hypoxia-inducible factor-1 α contributes to the antiangiogenic activity of red propolis polyphenols in human endothelial cells. **J. Nutr.** 142, 441-447. 2012.

DAUGSCH, A; MORAES, C. S; FORT, P; PARK, Y. Brazilian Red Propolis – Chemical Composition and Botanical Origin. **Evid. Based Complement. Alternat. Med.** 5(4): 435 - 441. 2007.

DEVEZA, L., CHOI, J., YANG, F. Therapeutic angiogenesis for treating cardiovascular diseases. **Theranostics.** 2: 801-814. 2012.

DEVOUW, L.M; DEVOUW, D.O. Protein kinase C activity contributes to endothelial hyperpermeability during early angiogenesis in the chick chorioallantoic membrane. **Tissue Cell.** 33:135-40. 2001.

DEWITT, N. 2005. ANGIOGENESIS: NATURE INSIGHT. 931.

DIAS, P.F., SIQUEIRA JR, J.M., VENDRUSCOLO, L.F., NEIVA, T.J., GAGLIARDI, A.R., MARASCHIN, M., RIBEIRO-DO-VALLE,

R.M. Antiangiogenic and antitumoral properties of a polysaccharide isolated from the seaweed *Sargassum stenophyllum*. **Cancer Chemother. Pharmacol.** 56: 436-446. 2005.

DIAS P.F., SIQUEIRA JR, J.M., MARASCHIN, M., FERREIRA, A.G., GAGLIARDI, A.R., RIBEIRO-DO-VALLE, R.M. A polysaccharide isolated from the brown seaweed *Sargassum stenophyllum* exerts antivasculogenetic effects evidenced by modified morphogenesis. **Microvasc. Res.** 75: 34-44. 2008a.

DIAS, P. F; BERTI, F.V; SIQUEIRA, J.M; MARASCHIM, M; GAGLIARDI, A. R; RIBEIRO-DO-VALLE, R M. Tras-resveratrol inhibits early blood vessel formation (vasculogenesis) without impairment of embryonic growth. **J. Pharmacol. Science.** 107(2): 118-27. 2008b.

DIMITROPOULOU, C.; MALKUSCH, W.; FAIT, E.; MARAGOUDAKIS, M.E.; KONERDING, M.A. The vascular architecture of the chick chorioallantoic membrane: sequential quantitative evaluation using corrosion casting. **Angiogenesis.** 2:255-263. 1998.

DJONOV, V.G; GALLI, A.B; BURRI, P.H. Intussusceptive arborization contributes to vascular tree formation in the chick chorioallantoic membrane. **Anat. Embryol.** 202:347-357. 2000.

DONG, L.F., SWETTENHAM, E., ELIASSON, J., WANG, X.F., Gold, M., MEDUNIC, Y., STANTIC, M., LOW, P., PROCHAZKA, L., WITTING, P.K., TURANEK, J., AKPORIAYE, E.T., RALPH, S.J., NEUZIL, J. Vitamin E analogues inhibit angiogenesis by selective induction of apoptosis in proliferating endothelial cells: The role of oxidative stress. **Cancer Res.** 67: 11906-11913. 2007.

DOTA, K.F.D.; CONSOLARO, M.E.L.; SVIDZINSKI, T.I.E.; BRUSCHI, M.L. Antifungal activity of Brazilian propolis microparticles against yeasts isolated from vulvovaginal candidiasis. **Evid. Based Complement. Alternat. Med.** 2011, 1-8. 2010.

ELISABETSKY, E.; SOUZA, G. C. Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substâncias ativas. In: SIMÕES, C. M; et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC, 2010. Cap. 6, p. 107 – 122.

ELLIS, L.M., HICKLIN, D.L. VEGF- targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity. **Nat. Rev. Cancer**. 8, 579-591. 2008.

ESFAHANIAN, N., SHAKIBA, Y., NIKBIN, B., SORAYA, H., MALEKI-DIZAJI, N., GHAZI-KHANSARI, M., GARJANI, A. Effect of metformin on the proliferation, migration, and MMP-2 and -9 expression of human umbilical vein endothelial cells. **Mol. Medicine Reports**. 5:1068-1074. 2012.

EVCIMENT, N.D.; KING, G.L. The role of protein kinase C activation and the vascular complications of diabetes. **Pharmacol. Res**. 55, 498-510. 2007.

FERNANDES-SILVA, C. C; FREITAS, J. C; SALATINO, A; SALATINO, M. L. F. Cytotoxic activity of six samples of Brazilian propolis on sea urchin (*Lytechinus variegatus*) eggs. **Evid. Based Complement. Alternat. Med**. 2013.

FERRARA, N., KERBEL, R.S. Angiogenesis as therapeutic target. **Nature**. 438, 967-974. 2005.

FERRARA, N., GERBER, H.P., LE COUTER, J. 2003. The biology of VEGF and its receptors. *Nature medicine* 9, 669–676.

FOLKMAN, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. **N. Engl. J. Med**. 285, 1182–1186. 1971.

FOLKMAN, J. Tumor Angiogenesis Factor. **Cancer Res**. 34: 2019-2113. 1974.

FOLKMAN, J. Is angiogenesis in organizing principle in biology and medicine? **J. Pediatr. Surg**. 42: 1-11. 2007.

FROZZA, C. O. S., GARCIA, C. S. C., GAMBATTO, G., SOUZA, M. D. O., SALVADOR, M., MOURA, S., PADILHA, F. F., SEIXAS, F. K., COLLARES, T., BORSUK, S., DELLAGOSTIN, O. A., HENRIQUES, J. A.P., ROESCH-ELY, M. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. **Food and Chem. Toxicol.** 52: 137–142. 2013.

GIANNI-BARRERA, R., TRANI, M., FONTANELLAZ, C., HEBERER, M., DJONOV, V., HLUSHCHUCK, R., BANFI, A. VEGF over-expression in skeletal muscle induces angiogenesis by intussusception rather than sprouting. **Angiogenesis.** 16: 123-136. 2013.

GIBBONS, L. Angiogenesis: Emerging Roles for the TG β Superfamily. **Pathways.** 11: 14-16. 2010.

GLIKI, G., WHEELER-JONES, C., ZACHARY, I. Vascular endothelial growth factor induces protein kinase C (PKC)-dependent Akt/PKB activation and phosphatidylinositol 3-kinase-mediated PKC δ phosphorylation: role of PKC in angiogenesis. **Cell Biology International.** 26 (9): 751–759. 2002.

GOODWIN, A.M. In vitro assays of angiogenesis for assessment of angiogenic and anti-angiogenic agents. **Microvas. Res.** 74: 172-183. 2007.

GUDJONSSON, J; JOHNSTON, A; DYSON, M; VALDIMARSSON, H; ELDER, J.T. Mouse models of psoriasis. **J. Investig. Dermatol.** 127:1292-1308. 2007.

HADJIPANAYIL, E; SCHILLING, A. F. Hypoxia-based strategies for angiogenic induction The dawn of a new era for ischemia therapy and tissue regeneration. **Organogenesis** 9:4, 1–12. 2013.

HANAHAN, D; FOLKMAN, J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. **Cell.** 86: 353–364. 1996.

HASAN, J; SHNYDER, S.D; BIBBY, M; DOUBLE, J.A; BICKNELL, R; JAYSON, G.C.

Quantitative Angiogenesis assays *in vivo* – review. **Angiogenesis**. 7:1-16. 2004.

HEIDENREICH, R.; RÖCHEN, M.; GHORESHI, K. Angiogenesis drives psoriasis pathogenesis. **Internat. J. Exp. Pathol.** 90: 232-248. 2009.

HEIL, M.; EITENMULLER, I.; SCHMITZ-RIXEN, T.; SHAPER, W. Arteriogenesis versus angiogenesis: Similarities and differences. **J. Cell Molec. Med.** 10, 45-55. 2006.

HELLSTROM, M; GERHARDT, H; KALÉN, M; LI, X; ERIKSSON, H; BETSHOLTZ, C. Lack of Pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis. **J. Cell Biol.** 153:543- 53. 2001.

HENDI, N. K. K; NAHER, H. S; AL-CHARRAKH, A.H. Iraqi propolis: the antimicrobial activities. **J. Medicin Plants Res.** 2011.

HEPSEN, I.F.; ER, H.; CEKIÇ, O. Topically applied water extract of propolis to suppress corneal neovascularization in rabbits. **Ophthalmic Res.** 31, 426-431. 1999.

HERBERT, S.P., STAINIER, D.Y.R., Molecular control of endothelial cell behaviour during blood vessel morphogenesis. **Nat Rev Mol Cell Biol.** 12: 551–564. 2012.

HERNANDEZ-FERNAUD, J. R; REID, S. E; NEILSON, L. J; ZANIVAN, S. Quantitative mass spectrometry-based proteomics in angiogenesis. **Proteomics Clin. Appl.** 00, 1-13. 2013.

HORI, J. I; ZAMBONI, D. S; CARRÃO, D. B; GOLDMAN, G. H; BERRETTA, A. A. The Inhibition of Inflammasome by Brazilian Propolis (EPP-AF). **Evid. Based Complement. Alternat. Med.** 2013, 1-11. 2013.

HUANG, S., YANG, N., LIU, Y., HU, L., ZHAO, J., GAO, J., LI, Y., LI, C., ZHANG, X., HUANG, T. Grape seed proanthocyanidins inhibit angiogenesis via the downregulation of both vascular endothelial growth factor and angiopoietin signaling. **Nutri. Res.** 32: 530-536. 2012.

IGURA, K., OHTA, T., KURODA, Y., KAJI, K. Resveratrol and quercetin inhibit angiogenesis in vitro. **Cancer Lett.** 28, 11-6. 2001.

Instrução Normativa nº3 de 19 de janeiro de 2001. Disponível em < <http://www.sfdk.com.br/imagens/lei/MA%20-%20Inst%20Norm%203.htm>. > Acesso em: 05 mai 2013.

IOZZO, R.V. Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. **Ann. Rev. Biochem.** 67: 609-652. 1998.

ISHIDA, V. F. C; NEGRI, G; SALATINO, A; BANDEIRA, M. F. C. L. A new type of Brazilian propolis: Prenylated benzophenones in propolis from Amazon and effects against cariogenic bacteria. **Food Chemistry.** 125: 966-972. 2011.

IZUTA, H., SHIMAZAWA, M., TSURUMA, K., AKAKI, Y., MISHIMA, S., HARA, H. Bee products prevent VEGF-induced angiogenesis in human umbilical vein endothelial cells. **Evid. Based Complement. Alternat. Med.** 9, 1-10. 2009.

JAKOB, W., JENTZSCH, K.D., MAUERSBERGER, B., HEDER, G. The chick embryo chorioallantoic membrane as a bioassay for angiogenesis factors: reactions induced by carrier materials. **Exp. Pathol.** 15:241-249. 1978.

JEON, H., KIM, H., CHOI, D., KIM, D., PARK, S.Y., KIM, Y.J., KIM, Y.M., JUNG, Y. Quercetin activates an angiogenic pathway, hypoxia inducible factor (HIF)-1-vascular endothelial growth factor, by inhibiting HIF-prolyl hydroxylase: a structural analysis of quercetin for inhibiting HIF-prolyl hydroxylase. **Mol. Pharmacol.** 71: 1676-1684. 2007.

JI, J.W; TSOUKIAS, N.M; GOLDMAN,D; POPEL, A. S.
Computational model of oxygen transport in skeletal muscle for sprouting and splitting modes of angiogenesis. **J. Theoretical Biol.** 241: 94–108. 2006.

JIN, U; CHUNG, T; KANG, S; SUH, S; KIM, J; CHUNG, K; GU, Y; SUZUKI, I; KIM, C.
Caffeic acid phenyl ester in propolis is a strong inhibitor of matrix metalloproteinase-9 and invasion inhibitor: Isolation and identification. **Clinica Chimica Acta** 362: 57–64. 2005.

JONES, N; ILJIN, K; DUMOND, D, J; ALITALO, K. Tie Receptors: New modulators of angiogenic and lymphagiogenic responses. **Nature Rev.** 2: 257-267. 2001.

KAKINO, M; IZUTA, H; TSURUMA, K; ARAKI, Y; SHIMAZAWA, M; ICHICHAHA, K; HARA, H. Laxative effects and mechanism of action of Brazilian green propolis. **Complem. Alternat. Medic.** 12:192. 2012.

KALLURI, R. Basement membranes: structure, assembly and role in tumor angiogenesis. **Nature Rev Cancer** 3, 423–433. 2003.

KEMPURAJ, D., MADHAPPAN, B., CHRISTODOULOU, S., BOUCHER, W., CAO, J., PAPADOPOULOU, N., CETRULO, C.L., THEOHARIDES, T. C. Flavonols inhibit proinflammatory mediator release, intracellular calcium ion levels and protein kinase C theta phosphorylation in human mast cells. **Brit. J.Pharmacol.** 145, 934–944. 2005.

KERBEL, R; FOLKMAN, J. Clinical translation of angiogenesis inhibitors. **Nature Rev.** 2:727-739. 2002.

KESHAVARZ, M; MOSTAFAIE, A; MANSOURI, K; SHAKIBA, Y; MOTLAGH, H.R.
Inhibition of Corneal neovascularization with propolis extract. **Arch. Med. Res.** 40: 59-61.

2009.

KIM, Y; WEST, X. Z; BYZOVA, T. V. Inflammation and oxidative stress in angiogenesis and vascular disease. **J. Mol. Med.** 91: 323–328. 2013.

KLEINER, D. E; STETLER-STEVENSON, W.G. Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases. **Anal. Biochem.** 218: 325 - 329. 1994.

KOLACZKOWSKA, E; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nature Reviews Immunology.** 13:159-175. 2013.

KOSALEC, I; BAKMAZ, M; PEPEEJNJAK, S; KNEZEVI, S.V. Quantitative analysis of the flavonoids in raw propolis from northern Croatia. **Acta Pharmaceut.** 54: 65-72. 2004.

KROL, W.; SCHELLER, S.; SHANI, J.; PIETSZ, G.; C ZUBA, Z. Synergistic effect of ethanolic extract of propolis and antibiotics on the growth of *Staphylococcus aureus*. **Arzneimittelforschung**, 43:607-609. 1993.

KUMAZAWA, S; GOTO, H; HAMASAKA, T; FUKUMOTO, S; FUJIMOTO, T; NAKAYAMA, T. A new prenylated flavonoid from propolis collected in Okinawa, Japan. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 68 (1): 260-262. 2004.

KUNIMASA, K; AHN, M; KOBAYASHI, T; EGUCHI, R; KUMAZAWA, S; FUJIMORI, Y; NAKANO, T; NAKAYAMA, T; KAJI, K; OHTA, T. Brazilian propolis suppresses angiogenesis by inducing apoptosis in tube-forming endothelial cells through inactivation of survival signal ERK1/2. **Evid. Based Complement. Alternat. Med.** 4: 1-7. 2009.

KUNIMASA, K; IKEKITA, M; SATO, M; OHTA, T; YAMORI, Y; IKEDA, M; KURANUKI, S; OIKAWA, T. Nobiletin, a citrus polymethoxyflavonoid, suppresses multiple angiogenesis-related endothelial cell functions and angiogenesis *in vivo*. **Cancer Sci.** 101: 2462-2469. 2010.

KUWANO, M; FUKUSHI, J; OKAMOTO, M; NISHIE, A; GOTO, H; ISHIBASHI, T; ONO, M; Angiogenesis Factors. **Internal Medicine.** 40: 565-572. 2001.

LAM, K. H., ALEX, D., LAM, I.K., TSUI, S.K., YANG, Z.F., LEE, S.M. Nobiletin, a polymethoxylated flavonoid from citrus, shows anti-angiogenic activity in a zebrafish *in vivo* model and HUVEC *in vitro* model. **J. Cell Biochem.** 112: 3313-21. 2011.

LAWRENCE, MC; JIVAN, A; SHAO, C; DUAN, L; GOAD, D; ZAGANJOR, E; OSBORNE, J; MCGLYNN, K; STIPPEC, S; EARNEST, S; CHEN, W; COBB, M.H. The roles of MAPKs in disease. **Cell Res.** 18:436-42. 2008.

LEE, C.S; JEON, E. B; KIM, Y. J; LEE, M. S; SEO, S. J; PARK, K. H; LEE, M.W. Quercetin-3-O-(2"-galloyl)- α -l-rhamnopyranoside inhibits TNF- α -activated NF- κ B-induced inflammatory mediator production by suppressing ERK activation. **Int. Immunopharmacol.** 16: 481-487. 2013.

LENG, T., MILLER, J.M., BILBAO, K.V., PALANKER, D.V., HUIE, P., BLUMENKRANZ, M.S. The chick chorioallantoic membrane as a model tissue for surgical retinal research and simulation. **Retina.** 24: 427-434. 2004.

LIAO, H.F; CHEN, Y.Y; LIU, J.J.; HSU, M.L; SHIEH, H.J.; LIAO, H.J.; SHIEH, C.J.; SHIAO, M.S.; CHEN, Y.J. Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on angiogenesis, tumor invasion, and metastasis. **J. Agric. Food Chem.** 51: 7907-7912. 2003.

LIECKENS, S., CLERCQ, R., NEYTS, J. Angiogenesis: regulators and clinical applications. **Biochem. Pharmacol.** 61: 253-270. 2001.

LOFTY, M. Biological activity of bee propolis in health and disease. **Asian Pac. J. Cancer Prev.** 7: 22-31. 2006.

LOPES, F.C.M., ROCHA, A., PIRRACO, A., REGASINI, L.O., SILVA, D.H.S., BOLZANI, V.S., AZEVEDO, I., CARLOS, I.Z., SOARES, R. Anti-angiogenic effects of pterogynidine alkaloid isolated from *Alchornea glandulosa*. **BMC Complement. Altern. Med.** 22: 9-15. 2009.

LU, K., CHAKROBORTY, D., SARKAR, C., LU, T., XIE, Z., LIU, Z., BASU, S. Triphala and its active constituent Chebulinic Acid are natural inhibitors of vascular endothelial growth factor – a mediated angiogenesis. **Plos one.** 7: e43934. 2012.

LUSTOSA, S.R; GALINDO, A.B; NUNES, L.C.C; RANDAU, K.P; NETO, P.J.R. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Rev. Bras. Farmacog.** 18(3):447-454. 2008.

LUTTUN, A; TJWA, M; MOONS, L; WU, Y; ANGELILLO-SCHERRER, A; LIAO, F; NAGY, J.A; HOOPER, A; PRILLER, J; DE KLERCK, B; COMPERNOLLE, V; DACI, E; BOHLEN, P; DEWERCHIN, M; HERBERT, J.M; FAVA, R; MATTHYS, P; CARMELIET, G; COLLEN, D; DVORAK, H.F; HICKLIN, D.J; CARMELIET, P. 2002. Revascularization of ischemic tissues by PIGF treatment, and inhibition of tumor angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt1. **Nature Medicine.** 8: 831-40.

MACHADO, J. L., ASSUNÇÃO, A. K. M., SILVA, M. C. P., REIS, A. S., COSTA, G.C., ARRUDA, D. S., ROCHA, B. A., VAZ, M. M. O. L. L., PAES, A. M. A., GUERRA, R. N. M., BERETTA, A. A., NASCIMENTO, F. R. F. **Evid. Based Complement. Alternat. Med.** Brazilian Green Propolis: Anti-Inflammatory Property by an Immunomodulatory Activity. Volume 2012.

MAHARAJ, A.S., D'AMORE, P.A. Roles for VEGF in the adult. **Microvas.Res.** 74: 100-113. 2007.

MARCUCCI, M.C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**. 26: 83-99. 1995.

MARCUCCI, M.C. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. **Quím. Nova**. 19(5): 529-536. 1996.

MARCUCCI, M.C.; FERRERES, F.; GARC-VIGUERA, C.; BANKOVA, V.S.; DE CASTRO, S.L; DANTAS, A.P.; VALENTE, P.H.M.; PAULINO, N. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. **J. Ethnopharmacol**. 74: 105-112. 2001.

MARQUELE, F; DI MAMBRO, V; GEORGETTI, S; CASAGRANDE, R.; VALIM, Y; FONSECA, M. Assessment of the antioxidant activities of Brazilian extracts of propolis alone and in topical pharmaceutical formulations. **J. Pharmaceut. Biomed. Analysis**. 39: 455-462. 2005.

MARTOS, M.V., RUIZ-NAVAJAS, Y., FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J., PÉREZ-ÁLVAREZ, J.A. Functional properties of honey, propolis and royal jelly. **J. Food Sci**. 73: 117-124. 2008.

MAURO, A., BUSCEMI, M., GERBINO, A. Immunohistochemical and transcriptional expression of matrix metalloproteases in full-term human umbilical cord and Human Umbilical Vein Endothelial Cells. **J. Mol. Hist.** 41:367-377. 2010.

McCORMICK, J. F., NASSAUER, J., BIELUNAS, J., LEIGHTON, J. Anatomy of the chick chorioallantoic membrane relevant to its use as a substrate in bioassay systems. **Scan. Electron. Microsc.** 4, 2023–2030. 1984.

MENEGHELLI, C; JOAQUIM, L.S.S; FÉLIX, G. L. Q; SOMENSI, A; TOMAZZOLI, M; SILVA, D. A; BERTI, F. V; VELEIRINHO, M. B. R; RECOUVREUX, D. O. S; ZERI, A. C. M. Z; DIAS, P. F; MARASCHIN, M. Southern Brazilian autumnal propolis shows anti-angiogenic activity: An in vitro and in vivo study. **Microvasc. Res**. 88: 1–11. 2013.

MENEZES, H. Própolis: Uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. **Arq. Inst. Biol.** 72: 405-411. 2005.

MESSERLI, S.M.; AHN, M.R.; KUNIMASA, K.; YANAGIHARA, M.; TATEJUJI, T.; HASHIMOTO, K.; MAUTNER, V.; UTO, Y.; HORI, H.; KUMAZAWA, S.; KAJI, K.; OHTA, T.; MARUTA, H. Artepillin C (ARC) in Brazilian green propolis selectively blocks oncogenic PAK1 signaling and suppresses the growth of NF tumors in mice. **Phytother. Res.** 23, 423-427. 2009.

MIRZOEVA, O. K.; CALDER, P. C. The effect of propolis and its components on eicosanoid production during the inflammatory response. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids** 55, 441-449; 1996.

MOCHLY-ROSEN, D; DAS, K; GRIMES, K. V. Protein kinase C, an elusive therapeutic target? **Nat Rev Drug Discov.** 11: 937-957. 2012.

MOORE, K.L.; DALLEY, A.F. Anatomia Orientada para a Clínica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. 5ª ed.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Met.** 65, 55-63. 1983.

MOTOMURA, M; KWON, K.M; SUH, S; LEE, Y; KIM, Y; LEE, I; KIM, M; KWON, D.Y; SUKUZI, I; KIM, C. Propolis induces cell cycle arrest and apoptosis in human leukemic U937 cells through Bcl-2/Bax regulation. **Environm. Toxicol. Pharmacol.** 26:61-67. 2008.

MOURA, S. A.L; FERREIRA, M.A.N.D; ANDRADE, S.P; REIS, M.L.C; NOVIELLO, M.L; CARA, D.C. Brazilian Green Propolis Inhibits Inflammatory Angiogenesis in a Murine Sponge Model. **Evid. Based Complement. Alternat. Med.** 9:1-7. 2009.

MUNDEL, T.M; KALLURI, R. Type IV collagen-derived angiogenesis inhibitors. **Microvasc. Res.** 74: 85-89. 2007.

NEWMAN, D. J; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **J. Natural Products.** 70: 461–477. 2007.

NGUYEN, M., SHING, Y., FOLKMAN, J. Quantitation of Angiogenesis and Antiangiogenesis in the Chick-Embryo Chorioallantoic Membrane. **Microvasc. Res.** 47: 31-40. 1994.

NICOLI, S.; PRESTA, M. The zebrafish/tumor xenograft angiogenesis assay. **Nature Protocols.** 2: 2918- 2923. 2007.

NIJVELDT, R.J., NOOD, E., HOORN, D.E., BOELEN, P.G., NORREN, K., LEEUWEN, P.A. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **Am. J. Clin. Nutr.** 74, 418–425. 2001.

NORRBAY, K. *In vivo* models of angiogenesis. **J. Cell. Mol. Med.** 10: 588-612. 2006.

NUGENT, M.A; IOZZO, R.V. Fibroblast grow factor-2. **Int. J. Biochem. & Cell Biol.** 32: 115-120. 2000.

OHTA, T; KUNIMASA, K; KOBAYASHI, T; SAKAMOTO, M; KAJI, K. Propolis suppresses tumor angiogenesis by inducing apoptosis in tube-forming endothelial cells. **Biosc. Biotech. Biochem.** 72: 2436-2440. 2008.

OKAMOTO, Y; HARA, T; EBATO, T; FUKUI, T; MASUZAWA, T. Brazilian propolis ameliorates trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in mice by inhibiting Th1 differentiation. **Int. Immunopharmacol.** 2013. *Article in press.*

OLIVEIRA, D.M; BASTOS, D. H. M. Biodisponibilidade de ácidos fenólicos. **Quim. Nova.** 34 (6): 1051-1056. 2011.

ORSOLIC, N.; BASIC, I. Immunomodulation by water-soluble derivative of propolis: a factor of antitumor reactivity. **J. Ethnopharmacol.** 84:265–273. 2003.

ORSOLIC, N.; KNEZEVIC, A.H.; SVET, L.; TERZIC, S.; BASIC, I. Immunomodulatory and antimetastatic action of propolis and related polyphenolic compounds. **J Ethnopharmacol.** 94:307–315. 2004.

OTROCK, Z.K.; MAHFOUZ, R.A.R.; MAKAREM, J.A.; SHAMSEDDINE, A.I. Understanding the biology of angiogenesis: Review of the most important molecular mechanisms. **Blood Cells Mol. Dis.** 39, 212-220. 2007.

PANDYA, N.M.; DHALLA, N. S.; SANTATNI, D.D. Angiogenesis – a new target for future therapy. **Vasc. Pharmacol.** 2006.

PARK, Y. K; ALENCAR, S.M; AGUIAR, C.L. Botanical Origin and Chemical Composition of Brazilian Propolis. **J. Agric. Food Chem.** 50: 2502 – 2506. 2002.

PARK, Y.K; IKEGAKI, M; ALENCAR, S. Classification of Brazilian propolis by physicochemical Method and biological activity. **Mensagem Doce.** 58: 2-7. 2000.

PEARCE, H.R.; KALIA, N.; BARDHAN, K.D.; BROWN, N.J. Effects of aspirin and indomethacin on endothelial cell proliferation in vitro. **J. Gastroenterol. Hepatol.** 18:1180-7. 2003.

PEEK, M.J., NORMAN, C., MARKHAN, R., FRASES, I.S., The chick chorioallantoic membrane assay: an improved technique for the study of angiogenic activity. **Exp. Pathol.** 34: 35–40. 1988.

PEREIRA, A.S; SEIXAS, F.R.M. S; NETO, F.R.A. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Química Nova.** 5 (2):321-326. 2002.

PHILLIPS, G. D.; WHITEHEAD, R. A.; KNIGHTON, D. R. Initiation and pattern of angiogenesis in wound healing in the rat. **Am. J. Anat.** 192: 257–262. 1991.

POTENTE, M.; GERHARDT, H.; CARMELIET, P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. **Cell.** 16: 873-887. 2011.

PRATHEESHKUMAR, P., BUDHRAJA, A., SON, Y., WANG, X., ZHANG, Z., DING, S., WANG, L., HITRON, A., CHAE-JEONG, L., XU, M., CHENZ, G., LUO, J., SHI, X.

Quercetin Inhibits Angiogenesis Mediated Human Prostate Tumor Growth by Targeting VEGFR- 2 Regulated AKT/mTOR/P70S6K Signaling Pathways. **Plos One.** 7: 1-10. 2012.

PRIOR, B.M; YANG, H.T; TERJUNG, R.L. What makes vessels grow with exercise training? **J. Applied Physiol.** 97: 1119-1128. 2004.

RAZAKANDRAINIBE, R., COMBES, V., GRAU, G.E., JAMBOU, R. Crossing the wall: the opening of endothelial cell junctions during infectious diseases. **Int. J. Biochem. Cell Biol.** 2013. *Article in press.*

REDDY, L., ODHAV, B., BHOOLA, K. D. Natural products for cancer prevention: a global perspective. **Pharmacol. Ther.** 99, 1-13. 2003.

Resolução da Diretora Colegiada (RDC) nº 24 de 14 de junho de 2010 (ANVISA). Disponível em: <ftp://ftp.saude.sp.gov.br/ftpsessp/bibliote/informe_eletronico/2011/iels.jun.11/Iels114/U_RS-MS-ANVISA-RDC-24_140611.pdf> Acesso em: 03 ago 2013.

Resolução Normativa nº 10 de 6 de dezembro de 1978, publicada no DOU de 15/02/79. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/catef/propolis.htm>> . Acesso em: 03 ago 2013.

RIBATTI, D., CRIVELLATO, D. “Sprouting angiogenesis”, a reappraisal. **Dev. Biol.** 2012. *Article in press.*

RISAU, W. Mechanisms of angiogenesis. **Nature.** 386: 671-674. 1997.

RODRÍGUEZ-CASO, L., REVES-PALOMARES, A., SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, F., QUESADA, A.R., MEDINA, M.A. What is known on angiogenesis-related rare diseases? A systemic review of literature. **J. Cell Mol. Med.** 2012. *Article in press.*

ROMERO, M., JIMENEZ, R., SANCHEZ, M. S., SEPÚLVEDA, R.L., ZARZUELO, M. J., O'VALLE, F., ZARZUELLO, A., PEREZ-VIZCAINO, F., DUARTE, J. Quercetin inhibits vascular superoxide production induced by endothelin-1: Role of NADPH oxidase, uncoupled eNOS and PKC. **Atherosclerosis.** 202: 58–67. 2009.

ROSSI, A., LONGO, R., RUSSO, A., BORELLI, F., SAUTEBIN, L. The role of the phenethyl ester of caffeic acid (CAPE) in the inhibition of rat lung cyclooxygenase. **Fitoterapia.** 73: 30-37. 2002.

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. **Current Oncology.** 13: 14-26. 2006.

SAHINLER, N.; KAFTANOGLU, O. Natural product propolis: chemical composition. **Natural Product Res.** 19: 183-188. 2005.

SALATINO, A; FERNANDES-SILVA, C.C; RIGHI, A.A; SALATINO, M. L. F. Propolis research and the chemistry of plant products. **Nat. Prod. Rep.,** 28: 925. 2011.

SALATINO, A; TEIXEIRA, E. W; NEGRI, G; MESSAGE, D. Origin and chemical variation of Brazilian propolis. **Evid Based Complement Alternat Med.** 2(1):33-38. 2005.

SALVUCCI, O., TOSATO, G. Essential Roles of EphB Receptors and EphrinB Ligands in Endothelial Cell Function and Angiogenesis. **Advances Cancer Res.**114:21-57. 2012.

SANTOS, M.D; BLATT, C. T. T. Teor de flavonóides e fenóis totais em folhas de *Pyrostegia venusta* Miers. de mata e de cerrado. **Rev. bras. Bot.** 21(2). 1998.

- SAWAYA, A. C. H. F; CUNHA, I. B. S; MARCUCCI, M. C.
Analytical methods applied to diverse types of Brazilian propolis.
Chem. Central J. 5:27. 2011
- SAWICKA, D.; CAR, H.; BORAWSKA, M.H.; NIKLINSKI, J. The anticancer activity of propolis. **Folia Histochemica et Cytobiologica.** 50: 25-37. 2012.
- SCHAAN, B. D. O papel da proteína quinase C no desenvolvimento das complicações vasculares do diabetes mellitus. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.** 6: 654-662. 2003.
- SCIFO, C; CARDILE, V; RUSSO, A; CONSOLI, R; VANCHERI, C; CAPASSO, F; VANELLA, A; RENIS, M. Resveratrol and propolis as necrosis or apoptosis inducers in human prostate carcinoma cells.
Oncol. Res. 14, 415-426. 2004.
- SEMENZA, G. L. Vasculogenesis, Angiogenesis and Arteriogenesis: Mechanisms of Blood Vessel Formation and Remodeling. *J. Cell. Biochem.* 102, 840–847. 2007.
- SFORCIN, J.M. Propolis and the immune system: a review. **J. Ethnopharmacol.** 113: 1-14. 2007.
- SFORCIN, J. M.; BANKOVA, V. Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? **J. Ethnopharmacol.** 133, 253-260. 2011.
- SHIMIZU, T., TAKESHITA, Y., TAKAMORI, Y., KAI, H., SAWAMURA, R., YOSHIDA, H., WATANABE, W., TSUTSUMI, A., PARK, Y.K.; YASUKAWA, K., MATNINO, K., SHIRAKI, K., KUROKAWA, M. Efficacy of Brazilian propolis against herpes simplex virus type 1 infection in mice and their modes of antiherpetic efficacies.
Evid. Based Complement. Alternat. Med. 2011, 1-9. 2011.
- SHIRVAIKAR, N.; MARQUEZ-CURTIS, L.A.; WIECZOREK, A.L. Hematopoietic Stem Cell Mobilization and Homing after Transplantation: The Role of MMP-2, MMP-9, and MT1-MMP.
Biochem. Res. Interna. 2012, 1-11. 2011.

SIEMENRINK, M.J., KLAASSEN, I., VAN NOORDEN, C.J.F., SCHLINGEMANN, R. O. Endothelial Tip Cells in Ocular Angiogenesis: Potential Target for Anti-Angiogenesis Therapy. **J. Histochem.Cytochem.** 61: 101–115. 2012.

SILVA, B.B.; ROSALEN, P.L.; CURY, J.A.; IKEGAKI, M.; SOUZA, V.C.; ESTEVES, A.; ALENCAR, S.M. Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of Brazilian propolis. **Evid. Based Complement. Alternat. Med.** 5, 313-316. 2007.

SLOW, R.C. Culture of human endothelial cells from umbilical veins. **Methods Mol Biol.** 806, 265-74. 2012.

SOARES, A. E. E. Abelhas africanizadas no Brasil: do impacto inicial às grandes transformações. Anais da 64ª Reunião Anual da SBPC – São Luís, MA – Julho/2012.

SOBHIA, M. E; GREWAL, B.K; MI, S. P; PATEL, J; KAUR, A; HAOKIP, T; KOKKULA, A. Protein kinase C inhibitors: a patent review (2008-2009). **Expert. Opin. Ther. Pat.** 23: 1297-315. 2013.

SONG, Y.S; PARK, E.H; JUNG, K.J; JIN, C. Inhibition of angiogenesis by propolis. **Arch. Pharmacol. Res.** 25: 500-4. 2002.

SOUZA, J.P.B; FURTADO, N.A.J.C; JORGE, R; SOARES, A.E.E; BASTOS, J.K. Perfis físico-químico e cromatográficos de amostras de própolis produzidas nas microrregiões de Franca (SP) e Passos (MG), Brasil. **Rev. Bras. Farmacog.** 17: 85-93. 2007.

SURI, C; JONES, P.F; PATAN, S; BARTUNKOVA, S; MAISONPIERE, P.C; DAVIS, S; SATO, T.N; YANCOPOULOS, G.D. Requisite role of Angiopoietin-1, a ligand for the Tie2 receptor, during embryonic angiogenesis. **Cell** 87: 1171–1180. 1996.

TAN, W., LIN L., LI, M., ZHANG, Y.X., TONG, Y., XIAO, D., DING, J. Quercetin, a dietary-derived flavonoid, possesses anti-angiogenic potential. **Eur. J. Pharmacol.** 459, 255–262. 2003.

TEIXEIRA, E. W; MESSAGE, D; NEGRI, G; SALATINO, A; STRINGHETA, P.C. Seasonal variation, chemical composition and antioxidant activity of brazilian propolis samples. **Evid. Based Complement. Alternat. Med.** 7(3):307-15. 2008.

The British Pharmacopoeia 2013. Disponível em:
<<http://www.pharmacopoeia.co.uk/2013/about.htm> > Acesso em: 03 ago 2013

TIRZIU, D.; SIMONS, M. Angiogenesis in the human heart: Gene and cell therapy. **Angiogenesis.** 8: 241-251. 2005.

TOBIA, C.; GARIANO, G.; DE SENA, G.; PRESTA, M. Zebrafish embryo as a tool to study tumor/endothelial cell cross-talk. **Bioch. Bioph. Acta.** 2013. *Article in press.*

TORTORA, G. Princípios de Anatomia Humana. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. 10ª ed.

TSUCHIYA, I; HOSOYA, T; USHIDA, M; KUNIMASA, K; OHTA, T; KUMAZAWA, S.
Nymphaeol-A Isolated from Okinawan Propolis Suppresses Angiogenesis and Induces Caspase-Dependent Apoptosis via Inactivation of Survival Signals. **Evid. Based Complement. Alternat. Med.** 2013: 1-9. 2013.

VARGAS, A.C.; LOGUERCIO, A.P.; WITT, N.M.; DA COSTA, M.M.; SÁ E SILVA, M., VIANA, L.R. Atividade antimicrobiana “in vitro” de extrato alcoólico de própolis. **Ciência Rural.** 34: 159-163. 2004.

VIEGAS, J. R. C; BOLZANI, V. S; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Quím. Nova.**, 29: 326-337. 2006.

VU, M. T., SMITH, C.F., BURGER, P.C., KLINTWORTH, G.K. An evaluation of methods to quantitative the chick chorioallantoic membrane assay in angiogenesis. **Lab. Invest.** 53, 499-508. 1985.

Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2413278>>
Acesso em: 14 fev 2013.

WACKER, A.; GERHARDT, H. Endothelial development taking shape. **Curr. Opin. Cell Biol.** 23: 676-685. 2011.

WANG, D., DUBOIS, R.N. Cyclooxygenase 2-derived prostaglandin E₂ regulates the angiogenic switch. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA.** 101: 415-416. 2004.

WANG, U, CHEN, Z.; ANDERSON, J. Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor Eph-B4. **Cell.** 93: 741-753. 1998.

WELSH, L.C., WELSH, M. VEGFA and tumour angiogenesis. **J. Inter. Med.** 273: 114-127. 2013.

WU, M.H; YUAN, Y; ZAWIEJA, D.C; TINSLEY, J; GRANGER, H.J. Role of phospholipase C, protein kinase C, and calcium in VEGF-induced venular hyperpermeability. **Am. J. Physiol.** 276, H535±H542. 1999.

WYLLIE, A.H; KERR, J.F; CURRIE, A.R. Cell death: the significance of apoptosis. **Int. Rev. Cytol.** 68: 251-306. 1980.

XU, K.; CLEAVER, O. Tubulogenesis during blood vessel formation. **Semin. Cell & Develop. Biol.** 22: 993-1004. 2011.

XUAN, H; ZHU, R; LI, Y; HU, F. Inhibitory Effect of Chinese Propolis on Phosphatidylcholine-Specific Phospholipase C Activity in Vascular Endothelial Cells. **Evid. Based Complement. Alternat. Med.** 2011: 1-8. 2010.

YADGARY, L.; UNI, Z. Yolk sac carbohydrate levels and gene expression of key gluconeogenic and glycogenic enzymes during chick embryonic development. **Poultry Science.** 91:444-453. 2011.

YANCOPOULOS, G.D; DAVIS, S; GALE, N.W; RUDGE, J.S; WIEGAND, S.J; HOLASH, J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. **Nature**. 407: 242-248. 2000.

YAYON, A; KLAGSBRUN, M; ESKO, J. D; LEDER, P; ORNITZ, D. M. Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. **Cell**. 22: 369-75. 1991.

ZHANG, X. L; CAO, M. A; PU, L.P; HUANG, S. S; GAO, Q.Y; YUAN, C; S; WANG, C. M. A novel flavonoid isolated from *Sophora flavescens* exhibited anti-angiogenesis activity, decreased VEGF expression and caused G0/G1 cell cycle arrest in vitro. **Pharmazie**. 68:369-75. 2013.

ZHANG, X.M., HUANG, S.P., XU, Q. Quercetin inhibits the invasion of murine melanoma B16-BL6 cells by decreasing pro-MMP-9 via the PKC pathway. **Cancer Chemother. Pharmacol**. 53: 82–88. 2004.