



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
FACULDADE DE MEDICINA
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS MÉDICO-
CIRÚRGICAS**

NAYANNA DE OLIVEIRA RAMOS MELO

**PRÓPOLIS VERMELHA NA ANGIOGÊNESE EM BOLSA JUGAL DE HAMSTER
SUBMETIDOS A IMPLANTE DE ESPONJA**

FORTALEZA

2018

NAYANNA DE OLIVEIRA RAMOS MELO

PRÓPOLIS VERMELHA NA ANGIOGÊNESE EM BOLSA JUGAL DE HAMSTER SUB-
METIDOS A IMPLANTE DE ESPONJA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Médico - Cirúrgicas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Médico-Cirúrgicas.
Área de concentração: Metabolismo, Fisiologia e Biologia Celular no Estresse.

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

FORTALEZA

2018

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

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

M486p Melo, Nayanna de Oliveira Ramos.
PRÓPOLIS VERMELHA NA ANGIOGÊNESE EM BOLSA JUGAL DE HAMSTER SUBMETIDOS A
IMPLANTE DE ESPONJA / Nayanna de Oliveira Ramos Melo. – 2018.
125 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médico-Cirúrgicas, Fortaleza, 2018.

Orientação: Profa. Dra. Conceição Aparecida Dornelas..

1. Inibidores da Angiogênese. . 2. Própolis.. 3. Inflamação. . 4. Mesocricetus. . I. Título.

CDD 617

NAYANNA DE OLIVEIRA RAMOS MELO

PRÓPOLIS VERMELHA NA ANGIOGÊNESE EM BOLSA JUGAL DE HAMSTER SUB-
METIDOS A IMPLANTE DE ESPONJA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Médico - Cirúrgicas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Médico -Cirúrgicas.
Área de concentração: Metabolismo, Fisiologia e Biologia Celular no Estresse.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. João Crispim Moraes Lima Ribeiro
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Roberto Wagner Bezerra De Araújo
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus, por me permitir chegar até aqui.

A minha mãe, Débora, por todos os investimentos feitos com muita dificuldade, em prol da minha educação, por seu amor, apoio, orações e torcida inquestionáveis.

Ao meu marido, Emiliano, por sua efetiva participação no desenvolvimento deste trabalho, realizada de forma brilhante, espontânea, dedicada e amorosa, demonstrando uma parceria inegável! Sem você, eu não teria conseguido!

Agradeço a minha irmã, Nayarah, por seu fundamental auxílio na execução deste trabalho, por suas palavras de encorajamento e apoio.

A minha sobrinha, Laurinha, que com sua doçura de criança alegra os meus dias.

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

À Prof.^a Dra. Conceição Aparecida Dornelas, pesquisadora e docente do Programa de Pós Graduação *stricto sensu* em Ciências Médico-Cirúrgicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, minha orientadora, pela grande oportunidade de participar de seu grupo de pesquisa, por me apresentar o instigante, lindo e ao mesmo tempo, árduo mundo do fazer Ciência! Agradeço por todos os ensinamentos, orientações e disponibilidade que foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho. Muito obrigada!

À Prof.^a Dra. Telma Leda Gomes de Lemos, docente do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará, por sua recepção no Laboratório de Biotecnologia e Produtos Naturais (LBPN) e essencial colaboração para a extração da própolis vermelha. À doutoranda em Química, Gisele Aguiar Rocha, por toda sua disposição em conduzir e auxiliar os procedimentos de extração da própolis vermelha.

Ao Prof. Dr. Francisco Vagnaldo Fachine Jamacaru, pesquisador do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, por sua receptividade em seu laboratório, disponibilidade e valorosa participação no estudo estatístico da quantificação da angiogênese pelo SQAN.

À Dra. Mayara Freire de Alencar Alves, biomédica, por sua amizade e essencial auxílio nas quantificações histológicas. Eternamente grata!!

Ao técnico, Sr. Francisco Deomar Maciel da Silva, pelo excelente trabalho desempenhado na confecção histológica das minhas lâminas. Muito obrigada!

Ao técnico do biotério, Sr. Bento Francisco de Oliveira, pelo cuidado com os meus animais e pelo apoio.

Aos professores doutores, Roberto Wagner Bezerra De Araújo, Ana Carolina Lindoso Melo e Vladimir Michailowsky Leite Ribeiro, por suas importantes contribuições no exame de qualificação.

A disponibilidade das instalações do Laboratório de Cirurgia Experimental e NPDM onde pude desenvolver este trabalho.

As secretárias do Departamento de Cirurgia, Sra. Maria Luciene Vieira de Oliveira, por todo o suporte dado desde o início, em especial a Sra. Magda Maria Gomes Fontenele por toda ajuda, informações e por suas palavras ânimo nos momentos difíceis desta caminhada.

Agradeço as colegas de Mestrado: Camila de Carvalho Juanes, bióloga, Vanessa Nogueira Lages Braga, enfermeira e nutricionista, pelo auxílio e apoio.

RESUMO

A angiogênese consiste na formação de novos vasos sanguíneos, a partir de outros vasos já existentes. É um processo que pode ocorrer de forma patológica, atuando na progressão de diversas doenças inflamatórias como, por exemplo: psoríase, endometriose, entre outras. Neste trabalho objetivou-se avaliar os efeitos da própolis vermelha na angiogênese em modelo de implante de esponja em bolsa jugal de hamster. Foram utilizados 48 animais divididos em 8 grupos. Os grupos I, II, III e IV (própolis vermelha 100 mg/5 ml/kg – celecoxibe 20 mg/kg – goma arábica 1% AP5 ml/kg – água 5 ml/kg, respectivamente) receberam as substâncias por 15 dias antes e 10 dias a partir do implante da esponja. Os grupos V, VI, VII e VIII (própolis vermelha 100 mg/5 ml/kg – celecoxibe 20 mg/kg – goma arábica PA 1% 5 ml/kg – água 5 ml/kg, respectivamente) foram tratados por 10 dias a partir do implante da esponja. A angiogênese foi avaliada por meio da determinação da área vascular média (AVM) em pixels (px) e em termos percentuais (%). No estudo dos grupos I, II, III e IV não foram verificadas diferenças estatísticas significantes entre os grupos nem para valores AVM (px) ($F = 2,6712$; $p = 0,0752$) e nem para valores AVM (%) ($F = 2,6711$; $p = 0,0752$). No estudo dos grupos V, VI, VII e VIII não foram verificadas diferenças estatísticas significantes entre os grupos nem para valores AVM (px) ($F = 0,6255$; $p = 0,6069$) e nem para valores AVM (%) ($F = 0,6255$; $p = 0,6069$) e não foram encontradas diferenças estatísticas significantes entre os grupos experimentais e seus controles. Na análise da inflamação (qualitativa), ocorreu redução de mastócitos no grupo I em relação ao grupo IV (controle) com diferença estatística significativa ($p = 0,013$). Na análise quantitativa, ocorreu redução no número de vasos sanguíneos no grupo I em relação ao grupo IV (controle) com diferença estatística significativa ($p = 0,007$); ocorreu aumento no número de macrófagos do grupo I em relação aos demais grupos (II, III e IV) com diferença estatística significativa ($p = 0,001$). A própolis vermelha inibiu a angiogênese quando administrada prévia e continuamente após o implante. A própolis vermelha possui efeitos imunomodulatórios em células inflamatórias (mastócitos e macrófagos).

Palavras-chave: Inibidores da Angiogênese. Própolis. Inflamação. Mesocricetus.

ABSTRACT

Angiogenesis consists in formation of new blood vessels from other vessels already existing. It is a process that can occur in a pathological way, acting in the progression of several inflammatory diseases such as psoriasis, endometriosis, among others. This work aimed to evaluate the effects of red propolis on inflammatory angiogenesis in a model of sponge implant in a hamster cheek pouch. We used 48 animals divided into 8 groups. Groups I, II, III and IV (were treated with red propolis 100 mg / 5 ml / kg - celecoxib 20 mg / kg - gum arabic 1% AP 5 ml / kg - water 5 ml / kg, respectively) for 15 days before and 10 days after the sponge implant. Groups V, VI, VII and VIII (were treated with red propolis - 100 mg / 5 ml / kg - celecoxib - 20 mg / kg -Arabic gum AP 1% -5 ml / kg -water- 5 ml / kg, respectively) for 10 days from the sponge implant. Angiogenesis was evaluated by determining the mean vascular area (AVM) in pixels (px) and in percentage terms (%). In the study of groups I, II, III and IV, no statistically significant differences between the groups for AVM (px) ($F = 2.6712; p = 0, 0752$) nor for AVM (%) values ($F = 2.6711, p = 0, 0752$). In the study of groups V, VI, VII and VIII, there were no statistically significant differences between the groups or AVM (px) values ($F = 0.6255; p = 0, 6069$) or AVM (%) values ($F = 0.6255, p = 0, 6069$) and no significant statistical differences were found between the experimental groups and their controls.

In the analysis of inflammation (qualitative), there was a decrease of mast cell in group I comparing to group IV (control) with a significant statistical difference ($p = 0, 013$); there was a decrease of blood vessels number in group I comparing to group IV (control) with significant statistical difference ($p = 0, 007$); there was an increase of macrophages number of group I comparing to the other groups (II, III and IV) with significant statistical difference ($p = 0, 001$). Red propolis inhibited angiogenesis when administered prior to and continuously after implantation. Red propolis has immunomodulatory effects on inflammatory cells (mast cells and macrophages).

Keywords: Angiogenesis Inhibitors. Propolis. Inflammation. Mesocricetus.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	– Angiogênese.....	18
Figura 2	– Regulação da angiogênese.....	19
Figura 3	– Etapas progressivas da angiogênese inflamatória.....	25
Figura 4	– Modelo de implante de esponja para estudo da angiogênese em rato.....	26
Figura 5	– <i>Appis melífera</i> no exsudato resinoso vermelho na <i>D. ecastaphyllum</i>	28
Figura 6	– Exsudato.....	28
Figura 7	– Estrutura química do celecoxibe.....	34
Figura 8	– Extração da própolis vermelha.....	41
Figura 9	– Bolsa jugal de hamster evertida.....	42
Figura 10	– Bolsa jugal de hamster fixada.....	43
Figura 11	– Delineamento do experimento.....	45
Figura 12	– Procedimento cirúrgico.....	47
Figura 13	– Implante de esponja em bolsa jugal de hamster 11 ° dia pós implante.....	49
Figura 14	– Ambiente do Sistema de Quantificação de Angiogênese – SQAN.....	50
Figura 15	– Microfotografia de cortes histológicos de diferentes implantes de esponja em mucosa jugal sendo identificado por setas (Hematoxilina Eosina 400x de aumento) A – microabscessos B – Mastócitos. C – Macrófagos. D - Linfócitos. E- Célula gigante. F - Granuloma de corpo estranho (círculo preto) (200x).....	52
Figura 16	– Quantificação da angiogênese pelo SQAN.....	55
Figura 17	– Número de vasos sanguíneos dos grupos I, II, III e IV.....	58
Figura 18	– Número de mastócitos dos grupos I, II, III e IV.....	59
Figura 19	– Número de macrófagos dos grupos I, II, III e IV.....	59
Figura 20	– Número de vasos sanguíneos dos grupos V ,VI, VII e VIII.....	61
Figura 21	– Número de células gigantes dos grupos V, VI, VII e VIII.....	61

LISTA DE QUADROS

Quadro 1–	Doenças tratáveis com a terapia de estimuladores e inibidores de angiogênese.....	22
Quadro 2–	Mediadores químicos do processo inflamatório.....	24
Quadro 3–	Trabalhos usando própolis e esponja.....	27
Quadro 4–	Pesquisas translacionais de modelos animais e atividade biológica da própolis vermelha em doenças inflamatórias dependentes de angiogênese.....	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Avaliação da inflamação dos grupos I, II, III e IV, por meio da determinação de escores, expressa em termos percentuais.....	56
Tabela 2 – Avaliação da inflamação dos grupos V, VI, VII e VIII, por meio da determinação de escores, expressa em termos percentuais.....	57
Tabela 3 – Avaliação quantitativa da inflamação dos grupos I, II, III e IV, expressa em média e erro-padrão da média.....	60
Tabela 4 – Avaliação quantitativa da inflamação dos grupos V, VI, VII e VIII, expressa em média e erro-padrão da média.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANG-1	Angiopoetina 1
ANG-2	Angiopoetina 2
AINES	Anti-inflamatórios não esteróides
BMP	Windows bitmap
CEUA	Comissão de ética no uso de animais
CO ₂	Dióxido de carbono
COX	Ciclooxigenase
COX-1	Ciclooxigenase 1
COX- 2	Ciclooxigenase 2
COBEA	Colégio brasileiro de experimentação animal
DP	Desvio padrão
ERO ^s	Espécies reativas de oxigênio
GAS	Goma de acácia
HE	Hematoxilina-eosina
HGF	Fator de crescimento de hepatócito
HIF-1	Fator induzido por hipóxia
HIF-1a	Fator 1 alfa induzido por hipóxia
HIF-1b	Fator 1 beta induzido por hipóxia
INO _s	Sintase induzível de oxido nítrico
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL- 12	Interleucina 12
IL- 17	Interleucina 17
LBP _N	Laboratório de biotransformações e produtos naturais
2-ME	2 metoxiextradiol
MCA	Membrana corialantóica
O ₂	Oxigênio
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PIGF	Fator de crescimento placentário
PGS	Prostaglandinas

PGE-2	Prostaglandina E2
SFE	Extração com fluido supercrítico
SQAN	Sistema de quantificação da angiogênese
TIE-2	Receptor tirosina quinase tie2
TNF	Fator de necrose tumoral
UFC	Universidade Federal do Ceará
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VEGFR-1	Receptor 1 de fator de crescimento endotelial vascular
VEGFR-2	Receptor 2 de fator de crescimento endotelial vascular
VEGFR-3	Receptor 3 de fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
1.1	Angiogênese.....	18
1.2	Inflamação.....	23
1.3	Esponja.....	25
1.4	Própolis.....	27
1.5	Extração da própolis.....	30
1.6	Hamster.....	31
1.7	Celecoxibe.....	33
1.8	Justificativa e relevância.....	37
2.	OBJETIVOS.....	38
2.1	Objetivo geral.....	38
2.2	Objetivos específicos.....	38
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
3.1	Animais.....	39
3.2	Substâncias utilizadas.....	39
3.2.1	Celecoxibe.....	39
3.2.2	Goma arábica PA.....	39
3.2.3	Própolis Vermelha.....	39
3.3	Extração da própolis.....	40
3.4	Modelo animal.....	42
3.5	Delineamento experimental.....	43
3.6	Procedimento cirúrgico: implante de esponja não absorvível.....	46
3.7	Aquisição e processamento das imagens.....	48
3.8	Eutanásia.....	49
3.9	Quantificação da angiogênese.....	49
3.10	Estudo histológico.....	51
3.11	Avaliação histológica microscópica.....	51
3.12	Análise estatística	53
4	RESULTADOS.....	54
4.1	Evolução clínica e mortalidade.....	54
4.2	Quantificação da angiogênese	55
4.3	Análise qualitativa da inflamação por meio de escores.....	55

4.3.1	Prevenção + Tratamento (Grupos: I Própolis Vermelha, II Celecoxibe, III Goma arábica e IV Água)	55
4.3.2	Tratamento (Grupos: V Própolis Vermelha, VI Celecoxibe, VII Goma arábica e VIII Água)	56
4.4	Análise quantitativa da inflamação.....	58
4.4.1	Prevenção + Tratamento (Grupos: I Própolis Vermelha, II Celecoxibe, III Goma arábica e IV Água)	58
4.4.2	Tratamento (Grupos: V Própolis Vermelha, VI Celecoxibe, VII Goma arábica e VIII Água)	60
5	DISCUSSÃO	63
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	71
7	CONCLUSÃO	72
	REFERÊNCIAS	73
APENDICE A	Microfotografias estereoscópicas por grupo experimental no ambiente do sistema de quantificação de angiogênese SQAN.....	92
APENDICE B	Tabela de avaliação qualitativa das lâminas na coloração de hematoxilina eosina por escore ausente leve moderado acentuado.....	100
APENDICE C	Somatório de escores dos achados histológicos em lâminas coradas em HE por grupo.....	104
APENDICE D	Tabela de média de pesos dos animais por grupo.....	105
APENDICE E	Tabela de consumo de substâncias por grupo.....	106
APENDICE F	Tabela de neovascularização por grupo.....	107
APENDICE G	Avaliação da angiogênese nos grupos I, II, III e IV, por meio da determinação da área vascular em imagens estereoscópicas panorâmicas da circunvizinhança da esponja, expressa em pixels e em termos percentuais....	111
APENDICE H	Avaliação da angiogênese nos grupos V, VI, VII e VIII, por meio da determinação da área vascular em imagens estereoscópicas panorâmicas da circunvizinhança da esponja, expressa em pixels e em termos percentuais	112
APENDICE I	Quantificação da inflamação dos grupos I e III (própolis vermelha e goma arábica respectivamente), por meio da determinação de escores, expressa em termos absolutos e percentuais.....	113
APENDICE J	Quantificação da inflamação dos grupos V e VII (própolis vermelha e	

goma arábica respectivamente), por meio da determinação de escores, expressa em termos absolutos e percentuais..... 114

APENDICE K Avaliação quantitativa da inflamação comparando os grupos I e III..... 116

APENDICE L Tabela de avaliação quantitativa da inflamação dos grupos I e III, expressa em média e erro-padrão da média..... 119

APENDICE M Avaliação quantitativa da inflamação comparando os grupos V e VII..... 120

APENDICE N Tabela de avaliação quantitativa da inflamação dos grupos V e VII, expressa em média e erro-padrão da média..... 123

ANEXO A Aprovação do projeto de pesquisa pelo CEUA - UFC..... 124

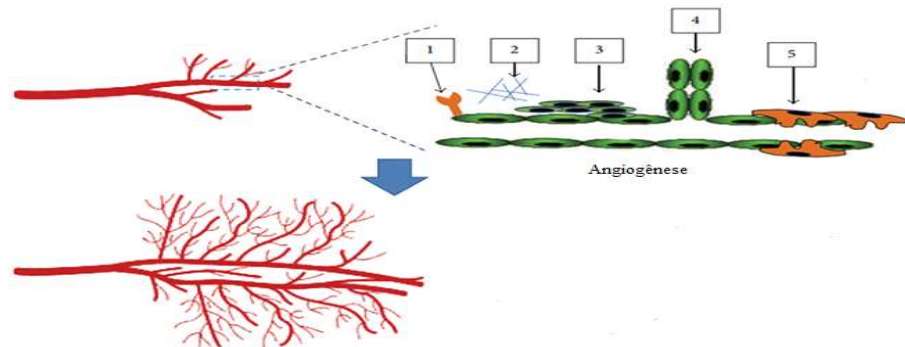
ANEXO B Composição nutricional da ração Nuvila CR- 1 irradiada..... 125

1 INTRODUÇÃO

1.1 Angiogênese

A angiogênese consiste na formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes (GUO *et al.*, 2017), ilustrada na figura 1.

Figura 1- Angiogênese



Fonte: (Adaptado de YOO; KWON, 2013).

Legenda: 1) Fatores angiogênicos se ligam aos seus receptores; 2) Degradação da membrana basal; 3) Proliferação e migração de células endoteliais, 4) Formação e remodelação do neovaso; 5) Estabilização do novo vaso formado.

Os vasos sanguíneos são fundamentais para o transporte de gases, nutrientes e retiradas de elementos tóxicos do organismo. A formação dos vasos sanguíneos inicia-se durante o período embrionário com os mecanismos de vasculogênese e angiogênese (RISSAU, 1991).

Para que ocorra o fenômeno da angiogênese é necessário que antes aconteça o processo de vasculogênese. A vasculogênese decorre de uma única célula primitiva, o angioblasto, que durante o período embrionário, sofre diferenciação e aderência por parte de células primitivas endoteliais formando o plexo vascular inicial (RISSAU, 1995). Posteriormente esse plexo sofre expansão, remodelação e estabilização (CARMELIET, 2003).

O termo angiogênese foi utilizado pela primeira vez em 1787 pelo cirurgião Dr. John Hunter, em que foi descrito o crescimento de vasos sanguíneos em chifres de renas (CARMELIET, 2005). Outros autores indicam que Rudolf Steine em 1900 foi o primeiro a publicar o termo angiogênese em um trabalho sobre suprarenais (COOKE, 2001), outros já relatam que o primeiro foi Arthur Tremanh Herting em 1935, em um trabalho sobre placenta (AUSPRUNK; FOLKMAN, 1977).

A angiogênese pode ocorrer por três mecanismos diferentes: brotamento, intussuscepção e formação de pontes celulares. No brotamento, as células do endotélio migram para o espaço extravascular formando brotos lateralizados. Na intussuscepção, ocorre invaginação da

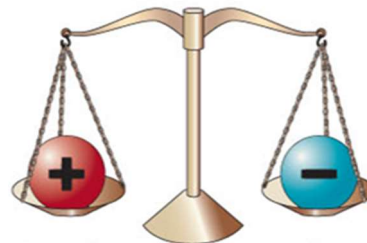
parede do vaso através de células periendothelias, dividindo o vaso em duas partes longitudinais. Na formação de pontes celulares, ocorre a formação de vasos únicos através das pontes transendothelias que fracionam a luz vascular, formando canalículos que se desprendem formando novos vasos (CONWAY; COLLEN; CARMELIET, 2001; DVORAK, 2003).

Esse processo ocorre em situações fisiológicas e patológicas (GUO *et al.*, 2017). De forma fisiológica ocorre na cicatrização tecidual, no sistema de reprodução feminino, no desenvolvimento embrionário e na formação de vasos colaterais em órgãos que apresentam regiões isquêmicas (KARAMAN *et al.*, 2017). A angiogênese patológica se manifesta pela formação de neovasos de forma deficiente ou excessiva (CARMELIET, 2005) e decorre do aumento da atividade de moléculas estimuladoras ou por queda da atividade dos inibidores (ZETTER, 2008). Um fino balanço entre moléculas que estimulam e inibem a formação do novo vaso, ilustrado na figura 2, é responsável pela regulação deste processo (FOLKMAN; KLAGSBRUN, 1987).

Figura 2- Regulação da Angiogênese

Estimuladores

Angiopoetina
 Fator de crescimento fibroblástico
 Fator de crescimento de hepatócito
 Fator de crescimento derivado de plaqueta
 Fator de crescimento endotelial vascular
 Interleucina 8



Inibidores

Angiostatina
 Antitrombina III
 Endostatina
 Interferon
 Interleucina 12
 2- Metoxiestradiol

Fonte: (Adaptado de ZETTER, 2008).

Dentre os mediadores químicos da angiogênese destaca-se o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) que é a molécula angiogênica mais potente. É um mitogênico para células endoteliais provenientes de artérias, veias e vasos linfáticos. Atualmente se conhecem seis formas de VEGF (A, B, C, D, E e o fator de crescimento placentário (PIGF)). De um único gene várias isoformas de VEGF podem ser geradas (VEGF 121, 165, 189, 206, 145, 183) (TISCHER *et al.*, 1991; FERRARA, 2001; LONGO *et al.*, 2002).

O VEGF A é responsável pela angiogênese (LONGO *et al.*, 2002) e sua interação com os receptores VEGFR1 estimula a migração celular; e VEGFR2 sinaliza para a ocorrência de mitogênese, permeabilidade e a sobrevivência das células endoteliais de capilares sanguíneos (KARAMYSHEVA, 2008). A permeabilidade aumentada pelo VEGF ligado ao seu receptor permite que a célula endotelial capte a molécula do lúmen e a transporte em pequenas vesículas

para o ablúmen. Isso também ocorre pelas junções pericelulares em casos de hiperpermeabilidade vascular crônica, como a encontrada nos tumores e em doenças inflamatórias (DVORAK *et al.*, 1996; DVORAK, 2003).

O fator 1 induzido por hipóxia (HIF-1) regula a expressão de VEGF e é composto por duas subunidades, fator 1 alfa induzido por hipóxia (HIF-1 α) e fator 1 beta induzido por hipóxia (HIF-1 β). A atividade biológica do HIF-1 depende da quantidade de HIF -1 α que na maioria das vezes é regulada pela tensão de oxigênio. Uma queda na concentração de O₂ e um aumento na concentração intracelular de HIF -1 α , que é uma proteína reguladora, estimula a transcrição do gene VEGF que atua sobre as células do endotélio, levando a proliferação das mesmas, bem como a produção de proteases e formação de brotos. As células das extremidades dos brotos captam o gradiente de VEGF e se movem na direção da fonte deste. Quando os neovasos estão formados e a concentração de O₂ se normaliza, a atividade do HIFI -1 α diminui e a produção de VEGF é finalizada e a angiogênese terminada. No tecido normal, oxigenado, a degradação de forma contínua da proteína HIF -1 α mantém a concentração da mesma baixa. Na presença de O₂, uma enzima que necessita de O₂, modifica a HIF -1 α de modo que ela seja alvo para degradação (FERRARA; GERBER; LECOUTER, 2003).

Dentre os estimuladores temos também, as angiopoetinas 1 e 2 (ANG1 e ANG2) que são responsáveis pela estabilização vascular ao se ligarem ao receptor tirosina quinase tie 2 (TIE2) e promoverem a sobrevida endotelial, através do recrutamento de pericitos. Os fatores de crescimento de fibroblastos são descritos como indutores de angiogênese e estimulam a proliferação e diferenciação de células do endotélio (EICHORN *et al.*, 2007). O fator de crescimento de hepatócito, foi inicialmente descrito como fator de ação específica no fígado. Atualmente é conhecido que esse fator atua como mitogênico em diversos tipos celulares (JESUS; WAITZBERG; CAMPOS, 2000). O fator de crescimento derivado de plaquetas funciona como mediador regulando a migração, proliferação e síntese de matriz de células endoteliais (PONTUAL; MAGINI, 2004). A interleucina-8 (IL-8), que é um fator de ativação de neutrófilos, é também um agente angiogênico potente (ARICI *et al.*, 1996).

Dentre os inibidores há a angiotatina que tem efeito inibitório na matriz extracelular, reduzindo a migração e invasão de células endoteliais; a endostatina é um proteoglicano encontrado na parede do vaso, inibe a migração, levando a apoptose (EICHORN *et al.*, 2007). Os interferons foram os primeiros reguladores endógenos antiangiogênicos identificados e inibem a secreção do fator de crescimento de fibroblastos (LINDNER, 2002). O 2 metoxiextradiol (2-ME), atua inibindo a proliferação de células endoteliais (YUE *et al.*, 1997).

O desequilíbrio da atividade molecular entre estimuladores e inibidores da angiogênese

contribui para o desenvolvimento de diversas doenças neoplásicas, inflamatórias (psoríase, endometriose), isquêmicas (isquemia cardíaca), infecciosas e imunitárias (artrite reumatóide) (CARMELIET, 2005).

A angiogênese patológica é responsável pela progressão de doenças inflamatórias como exemplifica o quadro 1, que podem ser tratadas inibindo ou estimulando a angiogênese.

Quadro 1 – Doenças tratáveis com a terapia de estimuladores e inibidores de angiogênese

INIBIDORES DE ANGIOGÊNESE	MOLÉCULA	ESTIMULADORES DE ANGIOGÊNESE	MOLÉCULA
Alzheimer ¹	VEGF	Cicatrização ¹⁹	PDGF
Artrite reumatoide ²	VEGF	Doença arterial periférica ²⁰	HGF
Artropatia hemofílica ³	VEGF	Doenças neurodegenerativas ²¹	VEGF
Asma ⁴	VEGF	Infarto do miocárdio ²²	Células progenitoras cardíacas
Aterosclerose ⁵	HIF		
Degeneração macular relacionada a idade ⁶	VEGF -A		
Dermatite atópica ⁷	(TNF), interleucinas (IL -8 e IL-17), VEGF, HIF, angiopoietinas		
Doença inflamatória intestinal ⁸	VEGF		
Doença renal crônica ⁹	VEGF		
Endometriose ¹⁰	VEGF		
Esclerose múltipla ¹¹	VEGF		
Espondiloartrite ¹²	VEGF		
Nefropatia diabética ¹³	Bloqueadores de receptores de angiotensina		
Neoplasias ¹⁴	VEGF		
Pré eclampsia ¹⁵	IL -6		
Psoríase ¹⁶	VEGF		
Retinopatia diabética ¹⁷	VEGF		
Encefalomielite autoimune ¹⁸	VEGF		

Fonte: Elaborado pela autora.

1(EICHEVERRIA *et al.*, 2017); 2 (LU *et al.*, 2017) ;3 (AGAPIDOU *et al.*, 2016); 4(HOSHINO; NAKAMURA, QUTAYBA, 2001); 5(CAMARÉ *et al.*, 2017) ; 6(SUN *et al.*, 2017); 7(RICHARZ; BOADA ;CARRASCOSA, 2017); 8 (ALKIM *et al.*, 2015) ;9(BALLERMANN; OBEIDAT, 2014) ;10(LI *et al.*, 2016);11(LENGFELD; CUTFORTH; AGALLIU, 2014) ;12(ELSHABRAWY *et al.*, 2015) ; 13(BEHL; KOTWANI, 2017) ; 14(PINHO, 2005) ; 15(KWIATKOWSKI *et al.*, 2016); 16(MARINA *et al.*, 2015) ; 17(ROMERO-AROCA *et al.*, 2016) ;18(MACMILLAN *et al.*, 2014);19(MENDONÇA; COUTINHO- NETTO, 2009) ;20(SUZUKI *et al.*, 2016) ;21(EICHEVERRIA *et al.*, 2017);22(LI *et al.*, 2017).

Os estudos sobre angiogênese desenvolveram-se de forma plena quando Folkman formula a hipótese, que a supressão do aporte sanguíneo, conseguiria inibir ou reduzir o crescimento tumoral (EICHHORN *et al.*, 2007), prevendo a descoberta de inibidores de angiogênese (FOLKMAN, 1971). Grande parte do conhecimento atual deve-se ao pesquisador Judah Folkman, pioneiro no estudo da angiogênese (PINHO, 2005).

Atualmente, algumas doenças já se beneficiam do uso de inibidores de angiogênese em sua terapêutica, como por exemplo, o uso dos inibidores: bevacizumabe, pegaptanibe e ranibizumabe, que inibem angiogênese, via VEGF, na degeneração macular relacionada a idade (BRATS, 2008).

1.2 Inflamação

A inflamação consiste em um mecanismo de defesa fisiológico do corpo, e é caracterizada por rubor, edema, calor, dor e perda de função; esse processo é responsável por iniciar o ataque a agentes patogênicos e por favorecer o processo de cicatrização, restaurando a homeostase (CALDER *et al.*, 2009). Os quatro primeiros sinais da inflamação foram nomeados por Celso na Roma Antiga e o último por Galeno (HURLEY, 1972). Apesar do reconhecimento da inflamação como parte do processo de cicatrização, até o final do século XIX, a mesma era vista como um fenômeno indesejável que poderia ser prejudicial ao hospedeiro. Entretanto, a partir do trabalho de Metchnikoff e outros pesquisadores, a contribuição da inflamação para o corpo nos processos de defesa e reparo foi reconhecida (PUNCHARD; WHELAN; ADCOCK, 2004).

A inflamação decorre de estímulos, como a agentes infecciosos (vírus, bactérias), físicos (corpos estranhos) ou químicos (drogas), liberando vários mediadores inflamatórios através de células imunes, como neutrófilos, macrófagos e linfócitos (SHRIHARI, 2017).

Estes mediadores químicos são moléculas responsáveis por modular os fenômenos vasculares e celulares que decorrem da inflamação. São de dois tipos: derivados de células e derivados do plasma sanguíneo, descritos no quadro 2.

Quadro 2– Mediadores químicos do processo inflamatório

DERIVADOS DE CÉLULAS	DERIVADOS DO PLASMA
Histamina	Sistema complemento
Serotonina (aminas vasoativas)	Cininas
Prostaglandinas	Fatores da coagulação
Leucotrienos	
Lipoxinas (metabólitos do ácido araquidônico)	
Fator de necrose tumoral,	
Quimiocinas	
Espécies reativas do oxigênio	
Óxido nítrico	
Enzimas lisossômicas dos leucócitos	
Neuropeptídios	

Fonte: Elaborado pela autora. (Adaptado de KUMAR *et al.*, 2008; RIDIANDRIES *et al.*, 2017).

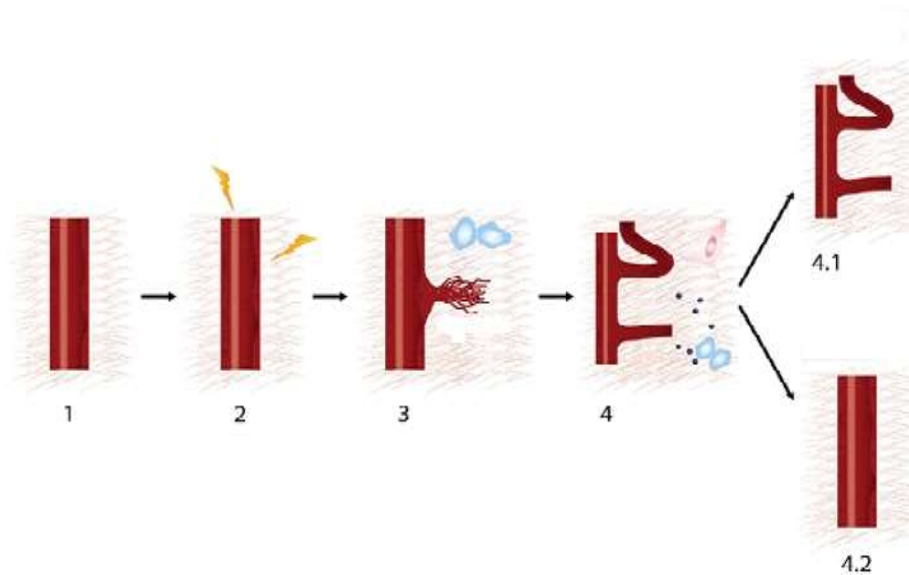
O processo inflamatório é classificado em agudo e crônico. A inflamação aguda é caracterizada pelo recrutamento de leucócitos da circulação, classicamente definido pelo tráfico inicial de granulócitos polimorfonucleares, seguido de monócitos que se diferenciam localmente em macrófagos (LAWRENCE; GILROY, 2007). É considerado um processo auto limitado (WANG; DUBOIS, 2015). É iniciada no local da lesão pela liberação de mediadores pró-inflamatórios tais como aminas e citocinas bioativas: fator de necrose tumoral (TNF) e interleucina 1(IL-1) (CHAPMAN *et al.*, 2013).

Atualmente, já é conhecido que as quimiocinas promovem a angiogênese induzida por inflamação, sendo assim a inibição das mesmas, atenuam a angiogênese patológica enquanto que preservam a angiogênese fisiológica, através da regulação condicional do VEGF e do fator 1 induzido por hipóxia (RIDIANDRIES *et al.*, 2017).

A interação entre células endoteliais ativadas e o sistema imune inato é um requisito para a ocorrência de resposta inflamatória aguda, que é um processo breve, intimamente ligado ao processo de reparo, e que, quando persistente, pode tornar-se um processo crônico (MUELLER, 2008).

A inflamação crônica resulta da persistência do estímulo de iniciação com a ativação associada de linfócitos e macrófagos. É nessa ocasião que o estímulo persistente de ativação das células endoteliais pode gerar brotamento capilar – angiogênese (ARROYO; IRUELA-ARIPSE, 2010), demonstrado na figura 3.

Figura 3 – Etapas progressivas da angiogênese inflamatória.



Fonte: (Adaptado de ARROYO; IRUELA-ARISPE, 2010)

Legenda: (1) Vasculatura quiescente. (2) A inflamação de forma sistêmica ou local estimula a angiogênese, aumentando a permeabilidade vascular e desestabilizando as junções das células endoteliais. (3) Proteólise da matriz extra celular pela célula endotelial durante o brotamento capilar induzido por estímulos inflamatórios. (4) Interação de forças mecânicas e sinalização de fatores de crescimento durante a angiogênese mediada por inflamação. A angiogênese induzida por inflamação pode ter dois destinos: 4.1 continuação da neovascularização e inflamação crônica; 4.2 regressão da vasculatura e reparo tecidual.

O dano excessivo nos tecidos contribui para a inflamação contínua, falha nos processos de reparo, desregulados com angiogênese e fibrose formando um ciclo contínuo. Enquanto a inflamação aguda ocorre com frequência e está contida inteiramente ao nível local, a inflamação crônica envolve uma resposta sistêmica (CHAPMAN *et al.*, 2013).

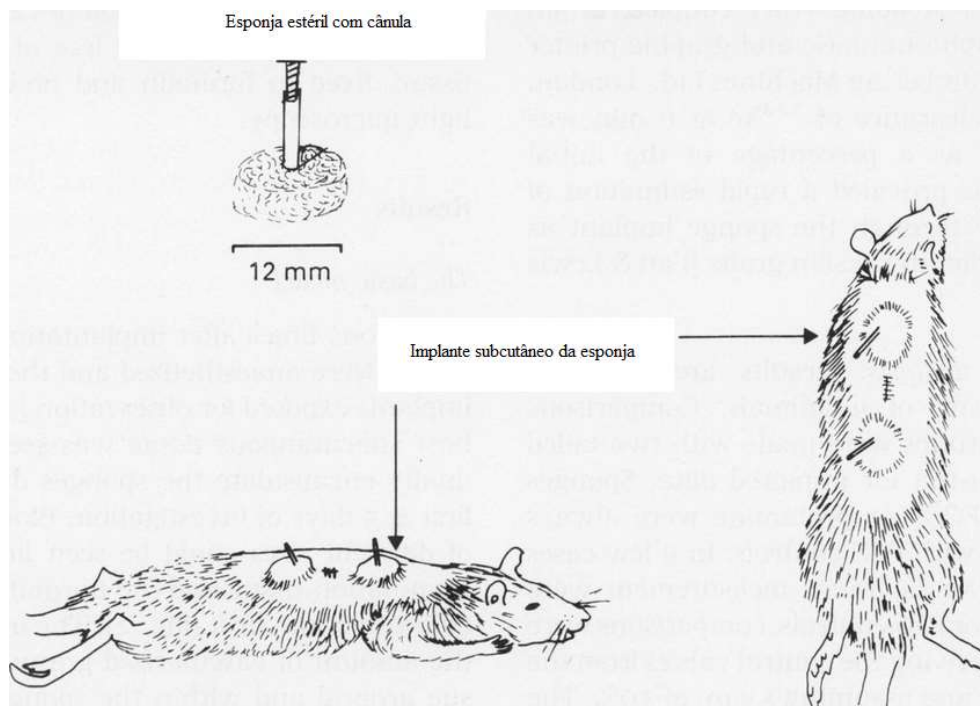
Na cicatrização de lesões cutâneas, o grau de angiogênese frequentemente se correlaciona com a resposta inflamatória, em grande parte devido as células inflamatórias produzirem em abundância mediadores pró angiogênicos. A diminuição seletiva da angiogênese inflamatória é sugerida como forma de melhorar a cicatrização. Uma vez que a inflamação excessiva produz um leito capilar denso, mas com uma perfusão ineficaz, resultando em uma cicatrização ineficiente (DIPIETRO, 2016).

1.3 Esponja

Em 1951, foi relatado o uso de esponja para implantes em cirurgia, utilizando um modelo de implantação subcutânea (GRINDLAY; WAUGH, 1951). Em 1975, foi desenvolvido o

modelo para estudo de inflamação aguda por implante de esponja (implante de três esponjas em ambos os lados da linha média na região torácica e lombar em ratos) (WIENER *et al.*, 1975). Posteriormente em 1987, esse modelo foi modificado, através da realização de implante de esponja no dorso animal para estudo *in vivo* quantitativo de angiogênese, utilizando uma cânula anexa ao implante para administração de substâncias teste (ANDRADE; FAN; LEWIS, 1987), ilustrada na figura 4.

Figura 4– Modelo de implante de esponja para estudo da angiogênese em rato.



Fonte: (ANDRADE; FAN; LEWIS, 1987)

O modelo de implante de esponja é utilizado para o estudo da angiogênese inflamatória, uma vez que o implante da esponja funciona como estímulo físico e de trauma tissular, propiciando a liberação dos mediadores inflamatórios, ocorrendo assim a angiogênese (CAMPOS *et al.*, 2006). Para estudar a angiogênese inflamatória foi escolhido o modelo de implante de esponja descrito por Andrade e colaboradores (1987), adaptado para bolsa jugal de hamster.

O modelo de implante de esponja para estudo de angiogênese consiste em um modelo quantitativo e reproduzível para avaliação da angiogênese (ANDRADE; FAN; LEWIS, 1987), apresentando precisão na avaliação as respostas angiogênicas e fibrogênicas, *in vivo*, proporcionando um espaço para a modulação do ambiente onde ocorre a angiogênese de forma a otimizar e adaptar a caracterização de elementos essenciais e sua atuação na formação de vasos sanguíneos em condições fisiológicas e patológicas, como por exemplo, em quadros inflamatórios

(ANDRADE; FERREIRA, 2016).

O implante de esponja permite avaliar cicatrização, metabolismo de colágeno, deposição de fibronectina, proliferação celular, tecido de granulação, acúmulo de neutrófilos e macrófagos dentro da esponja (ANDRADE; FERREIRA, 2009). Entretanto, algumas dessas reações podem ser decorrentes do material implantado e não pela substância teste ou substância inoculada na esponja. Os implantes podem formar células gigantes de corpo estranho, que produzem citocinas pró angiogênese, ocasionando interferências nos resultados dos testes (STATON; REED; BROWN, 2009).

As esponjas implantadas podem ser de diversos tipos de materiais: colágeno (LIDENBAUM *et al.*, 1989), poliéster poliuretano (CASTRO *et al.*, 2012), esponja de álcool polivinil (DIEGELMANN *et al.*, 1996), polietileno (WALSH *et al.*, 1997).

O quadro 3, demonstra alguns trabalhos onde esponjas foram implantadas em animais tratado com própolis.

Quadro 3-Trabalhos usando esponja e própolis.

SUBSTÂNCIA	AÇÃO	AUTOR
Própolis verde	Modulação da própolis na angiogênese inflamatória	LIMA <i>et al.</i> , 2014
Própolis verde	Inibição de angiogênese inflamatória	MOURA <i>et al.</i> , 2011
Própolis vermelha	Imunomodulação sobre a reação inflamatória, melhora na cicatrização por segunda intenção	BARRETO, 2008

Fonte: Elaborado pelo autor.

1.4 Própolis

A própolis consiste em um material natural resinoso, produzido por abelhas (*Apis mellifera*), conforme a vegetação que cerca a colméia, resultante da interação com enzimas salivares da abelha, pólen e ceras, (figuras 5 e 6) (HUANG *et al.*, 2014). A própolis apresenta variadas cores: verde, vermelha, marrom, entre outras, sendo composta por 50% de resina, 30% de cera, 10% de óleos essenciais, 5% de pólen e 5% de outras substâncias (SILVA CARVALHO; BALTAZAR; ALMEIDA AGUIAR, 2015).

A própolis é utilizada no revestimento interno das colméias, protegendo-as da entrada de elementos estranhos, mantendo a umidade e protegendo a colméia contra microorganismos (TORETI *et al.*, 2013). Na antiguidade o uso da própolis remonta ao ano 1700 A.C, onde era utilizada na Medicina popular em diferentes lugares do mundo, como por exemplo no Egito no

embalsamento dos mortos, na Grécia e Roma era usada como agente cicatrizante, antisséptico e analgésico (PEREIRA *et al.*, 2015), na Pérsia era usada no tratamento de eczemas, mialgia e reumatismos, enquanto que os povos Incas a usavam como antipirético (MOREIRA; ROGAO; ESTEVINHO, 2011).

Figura 5 - *Apis mellifera* no exsudado resinoso vermelho de *D. ecastophyllum*



Fonte:(MAGALHÃES *et al.*, 2011).

Figura 6-Exsudado



Fonte:(MAGALHÃES *et al.*, 2011).

A própolis possui importantes atividades biológicas: antioxidante (COSTA *et al.*, 2015; ESPINOSA *et al.*, 2015; BARBOSA *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2017; DANTAS *et al.*, 2017), anti-inflamatória (FANG *et al.*, 2013; BUENO-SILVA *et al.*, 2015; FRANCHIN *et al.*, 2016), antitumorais (BEGNINI *et al.*, 2014; PINHEIRO *et al.*, 2014; MENDONÇA *et al.*, 2015), imunomodulatória, antibacteriana (BUENO SILVA *et al.*, 2013; INUI *et al.*, 2014; GRENHO *et al.*, 2015; KUMAR *et al.*, 2015; LOPEZ *et al.*, 2015; REGUEIRA *et al.*, 2017), antifúngica (SILVA *et al.*, 2015; PIPPI *et al.*, 2015; SIQUEIRA *et al.*, 2015; NEVES *et al.*, 2016), analgésica, antiviral, anestésica, antiparasitária (SFORCIN, 2016; OMAR *et al.*, 2016; NASCIMENTO *et al.*,

2016), atividade cardioprotetora (DALEPRANE; ABDALLA, 2013; SILVA *et al.*, 2015), antiangiogênica (DORNELAS *et al.*, 2012; MENEGHELLI *et al.*, 2013), quimiopreventiva (DORNELAS *et al.*, 2012; FRANCHI *et al.*, 2012; DORNELAS *et al.*, 2014; RIBEIRO *et al.*, 2015), cicatrizante (SAXENA *et al.*, 2011; ALMEIDA *et al.*, 2013; JACOB *et al.*, 2015 HOZZEIN *et al.*, 2015) antiobesidade (SHIN *et al.*, 2014).

A própolis vermelha é encontrada no estado de Alagoas, no nordeste brasileiro e é caracterizada como sendo o décimo terceiro tipo de própolis, devido a sua origem botânica (família Leguminosae) diferente dos demais tipos (TELES *et al.*, 2015). A própolis vermelha apresenta uma composição química diferenciada, possuindo propriedades farmacológicas importantes que são relacionadas diretamente a seus compostos isolados: vestitol, neovestitol, quercetina, medicarpina, formononetina , polifenóis (MOSSALAYI *et al.*, 2014), flavonoides, que também são responsáveis pela atividade antioxidante da própolis vermelha (MENDONÇA *et al.*, 2015), pinocembrina, biochanina A (BARBOSA *et al.*, 2016) estéres, aminoácidos, podendo atingir diversos alvos terapêuticos (FREIRES; ALENCAR; ROSALEN, 2016). A constituição química de cada tipo de própolis e suas propriedades biológicas relacionam-se diretamente a sua origem botânica e geográfica (DALEPRANE; ABDALLA, 2013; MACHADO *et al.*, 2016).

A tipificação da própolis originária do Brasil foi proposta para padronizar a própolis, consistindo em um processo de identificação e quantificação química de compostos presentes em maior proporção em amostras de própolis de diferentes regiões brasileiras, através da presença de marcadores selecionados como sendo próprios da própolis brasileira, usando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (MARCUCCI, 2006).

O quadro 4 exemplifica a aplicação do uso da própolis em diferentes doenças inflamatórias que dependem da angiogênese para sua progressão.

Quadro 4—Pesquisas translacionais de modelos animais e atividade biológica da própolis vermelha em doenças inflamatórias dependentes de angiogênese

DOENÇAS INFLAMATÓRIAS	MODELO ANIMAL	ATIVIDADE BIOLÓGICA DA PRÓPOLIS
Artrite ¹	Modelo de artrite induzida por colágeno em ratos	Anti-inflamatória
Aterosclerose ²	Modelo de aterosclerose em ratos	Anti-inflamatória, antiangiogênica
Cicatrização cutânea ³	Modelo de reparo tecidual em ratos	Anti-inflamatória
Doença inflamatória intestinal ⁴	Modelo de colite ulcerativa em ratos	Anti-inflamatória
Doença renal crônica ⁵	Modelo de ablação renal em ratos	Anti-inflamatória, anti-hipertensiva
Esclerose múltipla ⁶	Modelo de encefalomielite auto imune em ratos	Antioxidante, anti-inflamatória
Esteatose hepática ⁷	Esteatose hepática em ratos	Antioxidante, anti-inflamatória
Infarto do miocárdio ⁸	Modelo de isquemia e reperfusão em ratos	Antioxidante, anti-inflamatória
Psoríase ⁹	Modelo de psoríase em ratos	Anti-inflamatória

Fonte: Elaborado pela autora

1(FRANCHIN *et al.*, 2016); 2(DALEPRANE *et al.*, 2012); 3(CORRÊA *et al.*, 2017); 4(BEZERRA *et al.*, 2017) 5(TELES *et al.*, 2015); 6(ILHAN *et al.*, 2004); 7(KISMET *et al.*, 2017); 8(OZER; PARLAKPINAR; ACET, 2004); 9(LEDON *et al.*, 1997).

1.5 Extração da Própolis

Devido às variadas propriedades da própolis, seus constituintes têm sido amplamente utilizados em diversos produtos (SILVA *et al.*, 2016), e para que isso seja possível é necessário produzir os extratos a partir da própolis em seu estado bruto. A própolis *in natura* apresenta substâncias solúveis em óleo ou em água e também solúveis nestes dois solventes ao mesmo tempo (KONISHI *et al.*, 2004).

A maior parte dos compostos da própolis apresenta solubilidade em óleo, por isso, o método de extração de própolis mais empregado utiliza o álcool etílico hidratado como solvente (extrato hidroalcoólico). Este solvente é aplicado, pois a própolis demonstra uma baixa solubilidade em água, tendo em vista as propriedades apolares da maior parte das substâncias que a constituem. Entretanto, o extrato hidroalcoólico pode causar reações adversas decorrentes do uso do álcool como solvente (MELLO; PETRUS; HUBINGER, 2010). Na extração hidroalcoólica, é utilizado etanol e água destilada. A concentração de etanol usada pode variar de 40% a 70% (SUZUKI, 2000).

O método consiste em adicionar a própolis a um determinado percentual de etanol por um período de tempo. Logo após o extrato líquido é centrifugado e o sobrenadante é separado e diluído para se obter a concentração final de extrato de própolis etanólico (BARBARIC *et al.*, 2011). Outra maneira é utilizar o extrator Soxhlet. Nesse método de extração, a amostra é aquecida a cerca de 70°C. O álcool etílico fica em refluxo contínuo até que o solvente, ao passar pelo sifão do Soxhlet, fique incolor. A metodologia foi adaptada para a extração da própolis

brasileira (MARCUCCI, 1994, 1995).

A extração aquosa de própolis consiste em macerar a própolis que se encontra em estado sólido. Posteriormente adicionar água destilada e colocar essa mistura em agitação (agitador magnético) durante um determinado período de tempo. Em seguida, o extrato aquoso passa por filtração (KHAYYAL; EL-HAZEK; EL-GHAZALY, 2015).

Como um importante método alternativo para obter extrato de própolis, temos a extração com fluido supercrítico (SFE), usando o dióxido de carbono (CO₂), como fluido. A técnica baseia-se na diluição da própolis bruta em dióxido de carbono líquido, em um determinado tempo, reduzindo a pressão até o valor inicial fazendo com que o CO₂ retorne ao estado gasoso. O resíduo desse processo é o componente útil da própolis dissolvida (SUZUKI, 2000). Esse método é vantajoso em relação aos métodos convencionais de extração da própolis, possuindo maior seletividade, reduzindo o uso de solventes orgânicos e otimizando o valor biológico dos extratos obtidos (MACHADO *et al.*, 2016).

Novos métodos de extração da própolis com baixo teor alcoólico ou isentas de álcool são propostos. Dentre as quais, destaca-se o extrato de própolis obtido com óleo vegetal de canola. Entretanto, esta possibilidade apresentou rendimento inferior e menores teores de substâncias fenólicas em comparação com os extratos hidroalcoólicos (BURIOL *et al.*, 2009).

Também é relatado a utilização do extrato de própolis em solução de goma arábica. A técnica consiste em obter, previamente, o extrato etanólico de própolis e, posteriormente solubilizar em goma arábica em uma concentração de 1% (NIRALA; BHADOURIA, 2008).

Diversos trabalhos já usaram a suspensão aquosa de própolis em goma arábica a 1% (SHUKLA; BHADOURIA; JADON, 2004) e a partir desse método foram verificados diversos avanços como, por exemplo, resultados positivos contra a toxicidade induzida por mercúrio (BHADOURIA *et al.*, 2008; ZHAO *et al.*, 2009) potencial hepatoprotetor do extrato de própolis contra a lesão crônica induzida por tetracloreto de carbono (BHADOURIA; NIRALA; SHUKLA, 2007; BHADOURIA; NIRALA; SHUKLA, 2008; BHADOURIA, 2012), potencial curativo da própolis contra a lesão hepatorenal induzida por acetaminofeno (BHADOURIA; NIRALA, 2009) e efeitos benéficos na terapia combinada contra a toxicidade sistêmica induzida pelo berílio (NIRALA *et al.*, 2008)

1.6 Hamster

O hamster, também conhecido como hamster sírio dourado, pertence à ordem Rodentia, família Cricetidae, gênero *Mesocricetus* e espécie *Auratus*. Possui corpo compacto e cauda muito curta. Seu comprimento, quando adulto, situa-se em torno de 15 cm a 17 cm. Possuem

peso médio de 90 a 125g e 95 a 140g para machos e fêmeas adultas, respectivamente; Temperatura corpórea média de 37,4°C, frequência respiratória média de 80 movimentos por minuto e frequência cardíaca que varia de 350 a 410 batimentos por minuto (ALONSO *et al.*, 2007).

Apresentam bolsas jugais que são invaginações bilaterais que têm aberturas na cavidade bucal e se estendem dorso-caudalmente, sob a pele dos ombros. No animal adulto, quando expandida, cada uma delas mede 4,0 cm - 5,0 cm de comprimento, aproximadamente 1,0 cm de largura e 0,4 mm de espessura. A principal função da bolsa jugal é o armazenamento de alimentos, sendo altamente distensíveis e ao serem evertidas, assumem um aspecto sacular (HOCHMANN *et al.*, 2003). O epitélio é plano estratificado, composto por camada basal de células cubóides, camada espinhosa com um a três níveis de células, camada granulosa composta por um a dois níveis de células achatadas e extrato córneo homogêneo e densamente corado pela hematoxilina-eosina (WHITE; GOHARI, 1981). Esse epitélio é sustentado pelo tecido conjuntivo denso, onde repousa tecido conjuntivo frouxo, altamente vascularizado. O tecido conjuntivo frouxo une a parede externa da bolsa às estruturas adjacentes, permitindo que ela seja facilmente evertida em animais anestesiados, facilitando a sua utilização em estudos experimentais (BARKER; BILINGHAM, 1977; HARDY *et al.*, 1986).

A bolsa jugal não apresenta circulação linfática, uma vez que as atividades específicas dos linfócitos, como o reconhecimento de antígenos e a interação com outras células, ocorrem nos órgãos linfóides secundários. Essa ausência resulta em bloqueio da resposta imune, o que define a bolsa jugal como “sítio imunologicamente privilegiado” (ARRUDA; NOGUEIRA; BORDON, 2002).

Desde a sua introdução como animal de laboratório na década de 1930, quando inicialmente foram capturados nas proximidades de Aleppo, no noroeste da Síria (TREFNA *et al.*, 2017) os hamsters foram utilizados como modelo animal em variadas áreas de pesquisa, pois seus aspectos fisiológicos e balanço energético são mais próximos aos parâmetros dos humanos do que muitos outros tipos de roedores (ROSS *et al.*, 2017).

Roedores, como o hamster (*Mesocricetus auratus*), são usados na pesquisa das mais diversas doenças, como exemplo: doença do Ebola (CLAIRE *et al.*, 2017), pancreatite (WANG *et al.*, 2016).

. A espécie também é utilizada em estudo experimental de infecções mistas por *Leishmania (L.) amazonensis* e *Leishmania (L.) infantum* (CELESTE *et al.*, 2017), em estudo sobre hiperlipidemia (ZHAO *et al.*, 2017) ciclo circadiano (MENDOZA-VIVEROS *et al.*, 2017), sendo úteis no desenvolvimento de modelos animais como exemplo, o modelo de pequeno animal para doenças infecciosas emergentes (WARNER; SAFRONETZ; KOBINGER, 2017).

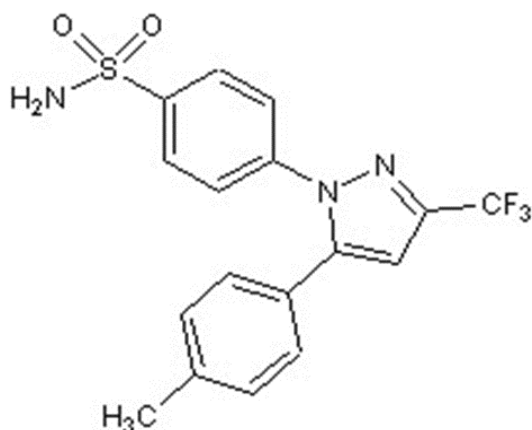
Diversos trabalhos já foram desenvolvidos e modelos animais estabelecidos em bolsa jugal de hamster como exemplo: estudo sobre carcinoma escamoso induzido por antraceno de 7,12-dimetilbenzo em hamsters sírios dourados (BABUKUMAR *et al.*, 2017), carcinogênese oral (MANIMARAN; MANOHARAN, 2017), modelo de estomatite em bolsa jugal (KAWANO *et al.*, 2016), modelo de mucosite oral (PRATS *et al.*, 2017), estudos de angiogênese patológica (BULANT *et al.*, 2017), estudo sobre isquemia e reperfusao (SOUZA *et al.*, 2015) ,e modelo experimental para a produção de abscesso amebiano (BEG *et al.*, 2004).

Devido a propriedade de sítio imunologicamente privilegiado, diversas pesquisas usaram do implante ou inoculação de substâncias e ou microorganismos na bolsa jugal como método para diversos tipos de estudo como exemplo: implantação primária de tumores humanos (WILLIAMS; EVANS; BLAMEY, 1971), implante de amálgama dentária (BERGMAN; BERGMAN; HELANDER, 1982), implante de tumor amelanótico (JACOBS, 1983), implante de discos (6 mm de diâmetro e 1 mm de espessura) de cloreto de polivinila (polietileno de baixa densidade) (ROY; WISHE, 1986), inoculação de *Trypanosoma cruzi* (BIJOVSKY; MILDNER, 1988), inoculação de *Candida albicans* (MCMILLAN; COWELL, 1992), inoculação de *Leishmania mexicana* (ARRUDA; NOGUEIRA; BORDON, 2002) e enxertos de pele total humana no subepitélio da bolsa jugal (HOCHMAN *et al.*, 2003).

1.7 Celecoxibe

O celecoxibe é um fármaco do tipo anti-inflamatório não esteroidal, que atua no bloqueio da produção de prostanóides oriundos do ácido araquidônico, através da inibição da enzima ciclooxigenase-2 (COX-2) (GHANGHAS *et al.*, 2016). A fórmula química do celecoxibe é ilustrada na figura 7.

Figura 7-Estrutura química do Celecoxibe



Fonte: Imagem disponível em: <http://www.ramdevchem.com/sturcuture/celecoxib.jpg>

A COX-2 está relacionada à inflamação, influenciando na resposta aos eventos vasculares, em tecidos lesados, contribuindo para o desenvolvimento de condições patológicas (SILVA; MENDONÇA; PARTATA, 2014), levando à síntese e ao acúmulo de prostanóides inflamatórios, em particular a prostaglandina (PGE-2), causando inflamação, edema e dor (ROSSAS *et al.*, 2014). Através da inibição da ciclooxigenase, esse fármaco apresenta propriedades anti-inflamatória, analgésica e antipirética (SILVA; MENDONÇA; PARTATA, 2014).

O uso de substâncias com propriedades anti-inflamatórias remonta ao Egito antigo, onde usava a casca de salgueiro e mirtilo para tratar dores reumáticas. E esse foi encontrado no papiro de Ebers, onde descreve o uso de plantas na terapia contra dores e processos inflamatórios (BLOBAUM; MARNETT, 2007).

Em 1899, foi sintetizado o primeiro fármaco anti-inflamatório não esteróide, Aspirina®, comercializado pela Bayer® (VANE, 2000). Em 1971, Sir John Vane e colaboradores, a partir do estudo sobre a atividade anti-inflamatória da aspirina demonstraram que essa atividade estaria ligada à capacidade desta substância inibir a produção de prostaglandinas (PGs), através de uma competição com o sítio ativo da enzima ciclooxigenase (COX). O pesquisador brasileiro, Sérgio Ferreira, que trabalhava junto com Vane, propôs a hipótese de que haveria isoformas desta enzima. Em 1990, foi comprovado que a COX é constituída por duas isoformas principais, com características químicas e fisiológicas bem definidas, a ciclooxigenase 1 (COX-1), constitucional e fisiológica, e a ciclooxigenase 2 (COX-2), inflamatória (MONTEIRO *et al.*, 2008).

A identificação da segunda isoforma da COX, a COX-2, pelo pesquisador Philip Needleman, possibilitou a investigação de moléculas que a bloqueiam especificamente, de modo a se manterem os efeitos anti-inflamatórios e analgésicos dos anti-inflamatórios não esteróideais

(AINES) mantendo as importantes funções homeostáticas da COX-1 (HAWKEY, 2005; TAKEMOTO *et al.*, 2008). Em 1995, começou a síntese da primeira geração de coxibes, dentre os quais o Celecoxibe (HAWKEY, 2005).

Atualmente, o celecoxibe é indicado para o tratamento sintomático da osteoartrite, artrite reumatóide, espondilite anquilosante, dor aguda no pós-operatório de cirurgia ortopédica ou odontológica e em doenças musculoesqueléticas, dismenorréia primária e lombalgias (CELEBRA: celecoxibe, 2017).

Na pesquisa, a aplicação do celecoxibe é estudada nas mais diversas linhas, apresentando bons resultados como, por exemplo, na melhora de sintomas psicóticos relacionados a esquizofrenia, uma vez que inibe a COX2, aumentando a resposta ao tratamento antidepressivo tradicional (LEONARD, 2017). O celecoxibe pode ser uma terapia auxiliar em episódios maníacos (sem características psicóticas) de adolescentes com transtorno de humor bipolar. O papel estabilizador do humor desta droga pode ser mediado através da sua ação em cascatas inflamatórias (MOUSAVI *et al.*, 2017).

Em estudo sobre processo inflamatório cerebral em ratos, o celecoxibe apresentou efeitos protetores, atenuando as lesões cerebrais devido às suas propriedades anti-inflamatórias (FAN *et al.*, 2013). Em pacientes portadores de úlceras, o celecoxibe reduziu o risco de episódios de sangramentos (ONUORA, 2017)

Várias pesquisas demonstraram um efeito benéfico do celecoxibe na progressão da aterosclerose. No entanto, esta evidência é derivada principalmente de dados preliminares, enquanto um vasto número de estudos clínicos levantou preocupações quanto à segurança cardiovascular dos inibidores da COX-2 (PAPAGEORGIOU *et al.*, 2016).

Apesar dos benefícios de celecoxibe, são relatados efeitos colaterais e riscos quando da sua utilização, como por exemplo: risco para infarto agudo do miocárdio (BALLY *et al.*, 2017), dor abdominal (XU *et al.*, 2016), disfunção renal, hipertensão arterial (HÖRL, 2010), entre outras.

O celecoxibe relacionado a angiogênese apresenta propriedades antiangiogênicas, relatada em diversos estudos, sendo considerado um quimiopreventivo no câncer de cólon através da inibição da angiogênese e indução da apoptose (GHANGHAS *et al.*, 2016), e no manejo clínico do câncer de próstata (BRIZZOLARA *et al.*, 2017).

A atividade antiangiogênica é descrita como notável quando do uso do celecoxibe em micela, em ensaio *in vivo* de membrana corioalantócica de embrião de pinto (MCA) (MANDRACCHIA *et al.*, 2016). No estudo que avalia a angiogênese e o efeito antitumoral do celecoxibe, verificou-se a redução da angiogênese em membrana corioalantócica de embrião de galinha

(CAM), inibição do crescimento e da densidade microvascular do tumor murino TA3-MTXR, redução da densidade microvascular das metástases tumorais, promoção da apoptose e redução do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e da produção de proliferação celular no tumor (ROSAS *et al.*, 2014). Existe uma associação da COX 2 com vascularização tumoral, densidade microvascular e VEGF. O celecoxibe tem se mostrado capaz de inibir fatores de crescimento em córneas (MAZHAR; WAXMAN, 2005).

Em modelo de hipertensão portal em ratos cirróticos, a combinação de celecoxibe melhorou a fibrose hepática através da inibição da angiogênese intra-hepática e extra-hepática (GAO *et al.*, 2016). Em modelo de retinopatia induzida por oxigênio em ratos, o celecoxib inibiu a angiogênese na retina por meio da expressão de HIF-1 alfa suprimindo a transcrição de VEGF (LIU; CHEN; CAI, 2015).

Na artrite, a angiogênese patológica, a inflamação e o estresse oxidativo foram inibidos pelo celecoxibe (EL-SAYED; MOUSTAFA; EL-AZAB, 2014). Em modelo de rato de reperfusão de isquemia de membro posterior, através de sua propriedade antiinflamatória e antioxidante, o celecoxibe pode melhorar as lesões em órgãos remotos, inibindo a ação da COX-2 (MALEK; SALEH, 2009).

Na cicatrização de ferida, o reparo tecidual é significativamente adiado pelo tratamento com celecoxibe, indicando que a COX-2 e seu produto, a prostaglandina E2 (PGE2) modulam a atividade de múltiplas funções essenciais do estroma inflamatório, incluindo proliferação epitelial, angiogênese e produção de matriz extracelular. Como resultado, a reepitelização e o encerramento da ferida são adiados pelo tratamento com celecoxibe (FAIRWEATHER *et al.*, 2015). Administração perioperatória de celecoxibe resultou na supressão da angiogênese nas anastomoses recém-formadas em cicatrizes de anastomoses colônicas (SYMEONIDIS *et al.*, 2014). Entretanto outro estudo relata que o uso do celecoxibe pode potencializar a cicatrização de úlceras por pressão uma vez que diminui a expressão de sintase induzível de óxido nítrico (iNOS) e COX-2, reduzindo a inflamação da ferida e promovendo a reparo dérmico e a formação de cicatrizes (ROMANA-SOUZA *et al.*, 2016).

O celecoxibe é amplamente considerado como inibidor da angiogênese, embora um estudo recente sugira que, em vez disso, ele promove o crescimento de vasos sanguíneos em linhas celulares de câncer (XU; GAO; SHU, 2011). Nanopartículas de celecoxibe foram capazes de induzir uma vascularização significativa do miocárdio isquêmico e dificultar a progressão da insuficiência cardíaca, o que aponta para uma nova abordagem para o tratamento da isquemia (MARGULIS *et al.*, 2015). Em modelo de cultura tridimensional, baixas dosagens de celecoxibe estimularam o crescimento do endométrio humano (REZAVAND *et al.*, 2013).

1.8 Justificativa e Relevância

A facilidade no acesso a produtos naturais com um menor custo, tendo em vista a biodiversidade existente a partir de seus produtos, estimula o desenvolvimento de importantes alternativas terapêuticas. Além de valorizar a nossa biodiversidade, é preciso aprofundar os conhecimentos e colocá-los a serviço da saúde e do bem estar do homem, premissa de todo avanço técnico e científico.

Tendo em vista a complexidade e as variadas propriedades biológicas da própolis, dentre as quais, a importante propriedade antioxidante que a própolis apresenta bem como a relação estabelecida entre resposta inflamatória decorrente de estresse oxidativo e ocorrência de angiogênese, verificadas em estudos experimentais *in vivo* e *in vitro*, tornaram-a relevante como objeto de investigação farmacológica.

A pesquisa de possíveis substâncias com propriedades estimuladoras e inibidoras de angiogênese são importantes pelo fato da angiogênese ser um denominador comum na fisiopatologia de mais de setenta doenças, que ainda não apresentam tratamento disponível. Na terapia de doenças inflamatórias dependentes de angiogênese, a própolis é vista como objeto de grande potencial terapêutico, uma vez que há relatos de inibição da angiogênese com própolis de diferentes procedências. Novas investigações trazem perspectivas no tratamento de muitas doenças que exigem proliferação de novos vasos em numerosas condições isquêmicas, como nas queimaduras, úlceras de pressão, úlceras em pés diabéticos, vascularização dos infartos cardíacos e encefálicos, impactando e melhorando a qualidade de vida dos pacientes acometidos por essas doenças.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos da própolis vermelha na angiogênese em bolsa jugal de hamster submetidos a implante de esponja.

2.2 Objetivos específicos

Estabelecer o modelo experimental para estudo da angiogênese em bolsa jugal de hamster submetidos a implante de esponja.

Validar o modelo experimental para estudo da angiogênese em bolsa jugal de hamster submetidos a implante de esponja através do estudo morfométrico pelo Sistema de Quantificação de Angiogênese (SQAN).

Avaliar o efeito da própolis vermelha na inflamação em bolsa jugal de hamster submetidos a implante de esponja.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto de pesquisa foi desenvolvido conforme o protocolo aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Ceará (UFC), em 26 de Março de 2016 (Protocolo nº 05/2016) conforme o anexo A, estando adequado aos princípios éticos na experimentação animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

3.1 Animais

Foram utilizados 48 hamsters fêmeas, Classe mammalia, Ordem rodentia, Família cricetidae, gênero *Mesocricetus*, espécie *Mesocricetus auratus* com 16 semanas de idade e com peso médio de 162 gramas. Os animais foram provenientes do biotério do Departamento de Cirurgia da Universidade Federal do Ceará. O laboratório do curso de Pós Graduação em Cirurgia foi sede dos procedimentos experimentais.

Os animais foram alojados em gaiolas de polipropileno de dimensões 41 cm x 34 cm x 16 cm, forradas com maravalha auto clavada. Foram alocados em número de 06 animais por gaiola. As gaiolas possuem tampa superior metálica contendo ração basal peletizada (ração Nutrilab® CR1 Quimtia S. A /composição química em anexo) e água potável *ad libitum*. Durante o experimento, os animais permaneceram no Biotério da Pós-Graduação em Cirurgia, sendo mantidos em temperatura média de 22 ° C, ciclo de luz de 12 horas claro/escuro, com sistema de exaustor contínuo.

3.2 Substâncias utilizadas

3.2.1 Celecoxibe

Celebra® 200 mg Laboratório Pfizer, administrado na dose de 20 mg/Kg peso, diluído em água destilada.

3.2.2 Goma arábica PA

Sendo utilizada na proporção de 1%, na dose de 5 ml/kg peso, diluída em água destilada (Fornecedor: Dinâmica Química Contemporânea LTDA).

3.2.3 Própolis vermelha

Administrado na dose de 100 mg/kg peso, extraída em goma arábica a 1%.

3.3 Extração da própolis

A própolis *in natura* utilizada é oriunda da cidade de Barra de Santo Antônio – Alagoas. Por ser praticamente insolúvel em água, foi realizada a extração etanólica, no Laboratório de Biotransformações e Produtos Naturais (LBPN) do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da UFC.

Para a obtenção do extrato etanólico de própolis vermelha, a própolis *in natura* foi triturada colocada em recipiente com etanol a 95% por 15 dias em temperatura ambiente. Posteriormente o extrato foi filtrado, e a seguir este extrato foi inserido em rotaevaporador, para evaporação do etanol. Finalmente foi deixado em banho maria para completa evaporação do álcool. Após evaporação, o extrato etanólico ‘mãe’ foi estocado a 4°C. O resultado final foi de um extrato vermelho viscoso, insolúvel em água com aroma adocicado. A figura 8 (8a.,8b.,8c.,8d.,8e.,8f.) ilustra o processo dessa extração.

Figura 8- Extração da própolis vermelha (A)- própolis vermelha *in natura* (B)- extração etílica (C)- filtração do extrato etílico (D)- extrato etílico no rotoevaporador (E)- extrato etílico no banho maria (F)-extrato de própolis vermelha.



Fonte: Imagens cedidas de ensaio não publicado, Camila de Carvalho Juanes.

Posteriormente, realizou a extração da própolis em goma arábica conforme protocolo descrito por Shulka, Bhadauria e Jadon (2004).

O extrato de própolis em goma arábica PA a 1% foi preparado semanalmente na dose de 100 mg/5ml/kg peso (100 mg de própolis para 5 ml de goma arábica PA a 1% por kg de peso do animal). A extração em solução aquosa de goma arábica PA a 1% foi feita a quente em estufa com temperatura de 60°C, sob agitação mecânica manual periódica de 5 em 5 minutos, totalizando 30 minutos.

Como a própolis vermelha foi extraída em solução de goma arábica PA a 1%, estabeleceu-se um grupo controle, ao qual foi administrado solução de goma arábica PA a 1% na dose de 5,0ml/kg peso. As doses foram preparadas semanalmente, conforme variação do peso dos animais.

3.4 Modelo animal

Para avaliação da angiogênese foi utilizado um modelo de bolsa jugal de hamster (figuras 9 e 10) da espécie *Mesocricetus auratus*.

Figura 9-Bolsa jugal de hamster evertida.

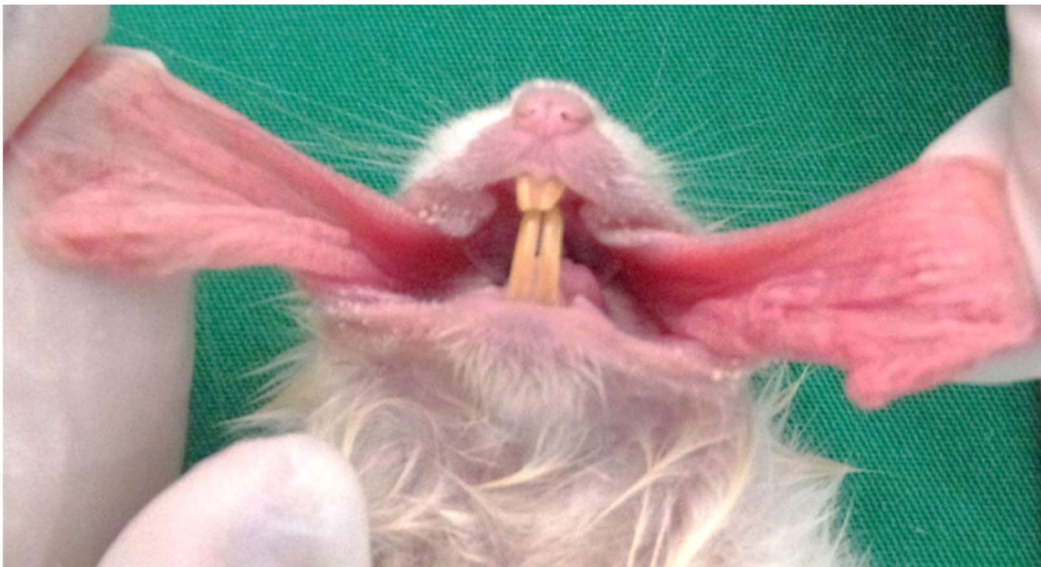


Figura 10-Bolsa jugal de hamster fixada.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

3.5 Delineamento experimental

Foram utilizados 48 hamsters fêmeas, distribuídas em 8 grupos contendo 06 animais cada, relacionados a seguir:

O grupo I (n=6), recebeu própolis vermelha, na dose de 100 mg/Kg peso durante 15 dias. No 16º dia de experimento, foi realizado o implante da esponja, e a seguir, própolis vermelha na mesma dose por 10 dias.

O grupo II (n=6), celecoxibe diluído em água destilada estéril, na dose de 20 mg/Kg peso durante 15 dias. No 16º dia de experimento, foi realizado o implante da esponja, e a seguir, celecoxibe na mesma dose por 10 dias.

O grupo III (n=6), goma arábica PA a 1%, diluída em água destilada estéril, na dose de 5ml/Kg peso durante 15 dias. No 16º dia de experimento, foi realizado o implante da esponja, e a seguir, goma arábica PA a 1 % na mesma dose por 10 dias.

O grupo IV (n=6), água destilada estéril, na dose de 5ml/Kg peso durante 15 dias. No 16º dia de experimento, foi realizado o implante da esponja, e a seguir, água destilada estéril na mesma dose por 10 dias.

O grupo V (n=6), após procedimento cirúrgico, recebeu própolis vermelha, na dose de

100 mg/Kg peso por 10 dias.

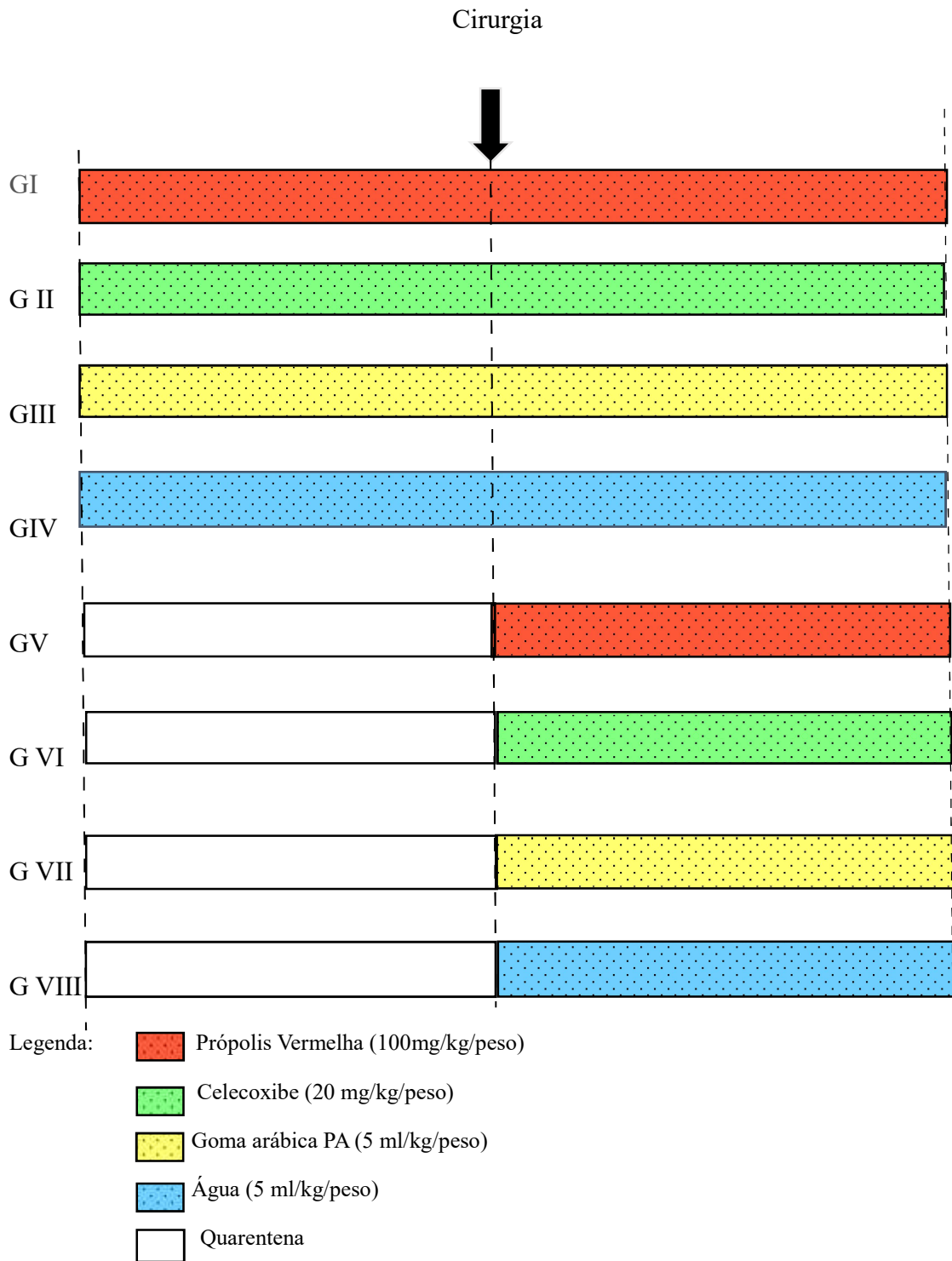
O grupo VI (n=6), após procedimento cirúrgico, recebeu celecoxibe diluído em água destilada estéril, na dose de 20 mg/Kg peso por 10 dias.

O grupo VII (n=6), após procedimento cirúrgico, recebeu goma arábica PA a 1%, diluída em água destilada estéril, na dose de 5ml/Kg peso por 10 dias.

O grupo VIII (n=6), após procedimento cirúrgico, recebeu água destilada estéril, na dose de 5ml/Kg peso por 10 dias.

Todas as substâncias foram administradas por via subcutânea na região dorso cervical em dose diária e única. Os animais foram pesados semanalmente e as doses foram preparadas semanalmente, conforme a média de peso de cada grupo.

O experimento teve a duração de 25 dias para os grupos de prevenção + tratamento (grupos I, II, III e IV), e duração de 10 dias para os grupos de tratamento (grupos V, VI, VII e VIII), com eutanásia no 11º dia após o procedimento cirúrgico de implante da esponja. O critério de exclusão para avaliação da angiogênese foi a presença de material purulento na região de implante da esponja. A figura 11 ilustra o delineamento do experimento.

Figura 11- Delineamento do experimento

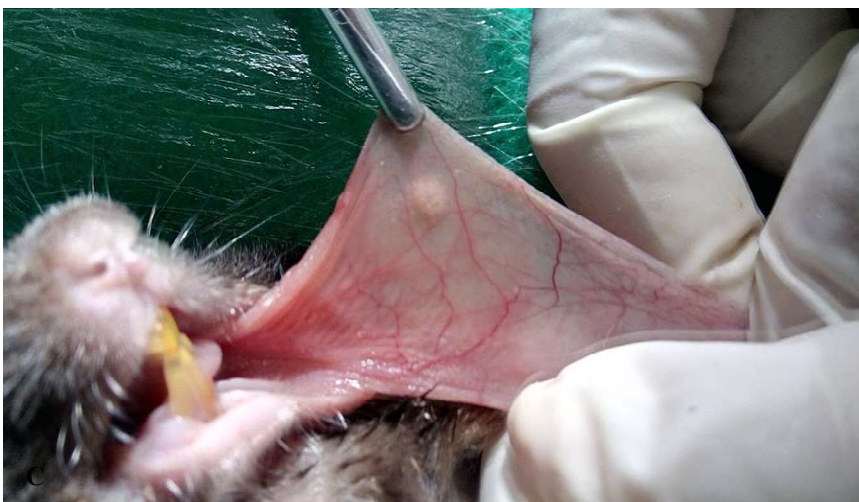
3.6 Procedimento cirúrgico: implante de esponja não absorvível

Para implante foi utilizada esponja de polipropileno (esponja facial de pó compacto) (marca Marchetti[®]) cortada na dimensão de 3 mm de diâmetro utilizando um vazador manual (marca Elisabeth Graziano-EPP), que foi esterilizada por auto clave.

As cirurgias foram realizadas nos animais sob anestesia, por injeção intraperitoneal de ketamina e xilazina nas respectivas doses: 100 mg/Kg peso e 10 mg/kg peso, de acordo com a média de peso dos grupos. Os procedimentos operatórios seguiram o rigor das normas convencionais de antisepsia e assepsia. Usaram-se luvas de procedimento de látex estéreis para cada animal operado, bem como gazes e seringas estéreis.

As bolsas jugais foram higienizadas com solução fisiológica estéril, por meio de seringa de plástico estéril sem agulha, a fim de retirar resíduos alimentares e eventual uso auxiliar de gazes estéreis na higienização. Em seguida, a bolsa jugal esquerda foi exteriorizada por manobra de eversão, permanecendo distendida através de duas pinças (dissecção e digital), realizado prega simétrica com o epitélio da bolsa, com exposição da face medial pelo cirurgião e auxiliar. Com agulha de insulina, feito injeção de 0,1 ml de solução fisiológica no sub epitélio da bolsa jugal, criando o espaço para implante da esponja (figura 12 A), com a pinça colibri realizada diminuta abertura de 1 mm no local de inserção da agulha (figura 12 B) e introduzida a esponja neste espaço (figura 12 C). Após posicionamento da esponja, realizada uma delicada compressão digital.

Figura 12- Procedimento cirúrgico (A) Injeção de soro fisiológico para criar espaço para o implante da esponja- (B) Diminuta abertura através de pinça colibri – (C) Implante da esponja.



Fonte: Elaborada pelo autor.

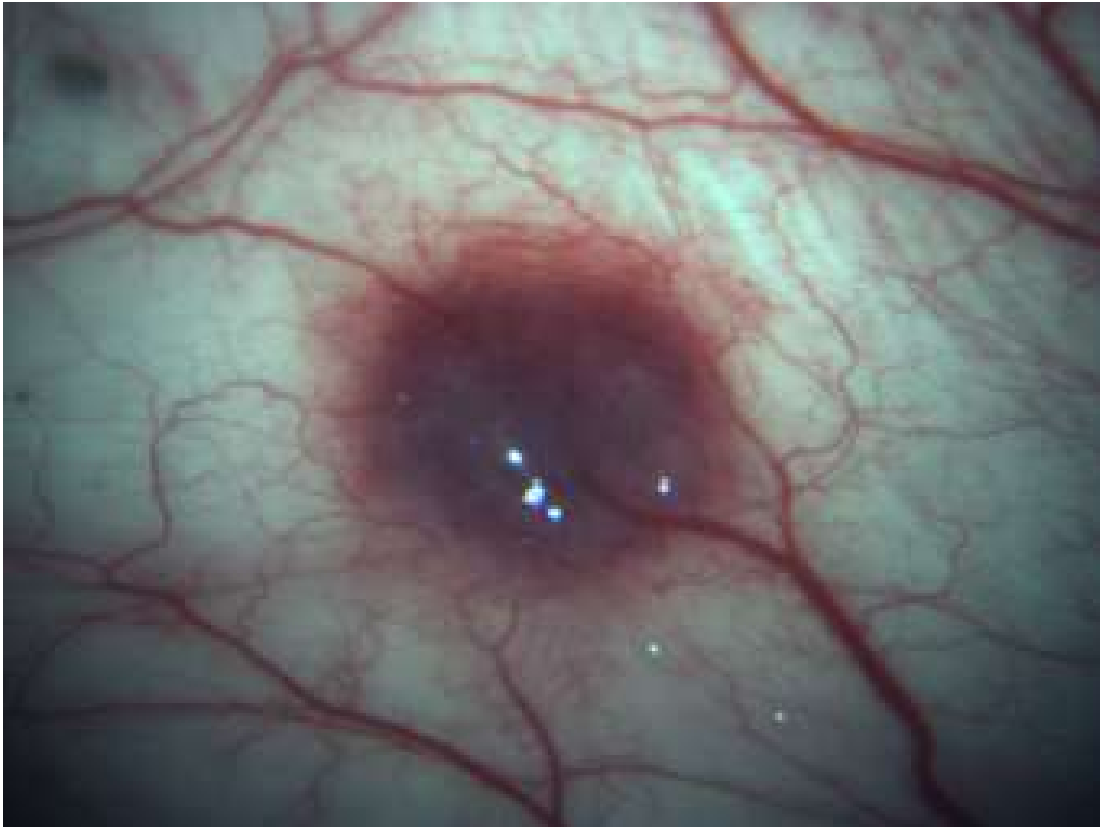
A abertura do epitélio foi ocluída por simples compressão digital, seguindo-se de hidratação da bolsa jugal com solução fisiológica e invaginando a bolsa para dentro da cavidade oral. Os animais foram observados até sua plena recuperação anestésica, posteriormente foram encaminhados para o biotério.

3.7 Aquisição e processamento das imagens

No 11º dia após o implante, os animais foram anestesiados, e a bolsa jugal foi evertida e higienizada com soro fisiológico a fim de retirar possíveis resíduos alimentares. Realizada avaliação macroscópica, verificando a presença do implante e a presença de possíveis secreções purulentas, seguindo a ressecção da base da bolsa jugal através de bisturi elétrico priorizando a cauterização dos vasos sanguíneos antes da retirada da bolsa jugal do animal.

Após a retirada da bolsa, a mesma foi fixada em uma estrutura de borracha, através de agulhas de insulina, e posteriormente umedecida com soro fisiológico para manutenção do tecido em estudo e facilitar a captura das imagens do mesmo. Após o término da captura de imagens, as bolsas jugais foram fixadas em acetato com fio nylon, mantendo sua estrutura distendida e acondicionadas em frascos de plásticos contendo formol a 10% tamponado para manutenção do tecido. Os animais foram eutanasiados por apronfundamento da dose anestésica. As microfotografias estereoscópicas do implante (figura 13) foram capturadas de forma padronizada nos quatro quadrantes da periferia do implante: superior, inferior, direito e esquerdo, usando um aumento de 25 vezes. Nas imagens panorâmicas de cada bolsa jugal foi utilizado um aumento de 16 vezes. Foi utilizado um microscópio cirúrgico (D. F. Vasconcellos M90, D. F. Vasconcellos S.A., São Paulo – SP) conectado a um microcomputador equipado com um sistema de captura de vídeo (PixelView® PV-TV304P, Prolink Microsystems Corp. Taiwan).

Figura 13- Implante de esponja em bolsa jugal de hamster, 11° dia pós implante.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Notam-se vasos sanguíneos direcionados a esponja. Microfotografia estereoscópica panorâmica com aumento de 16 vezes.

As microfotografias estereoscópicas panorâmicas e as relativas aos quatro quadrantes foram então capturadas e armazenadas no formato Windows® Bitmap (BMP).

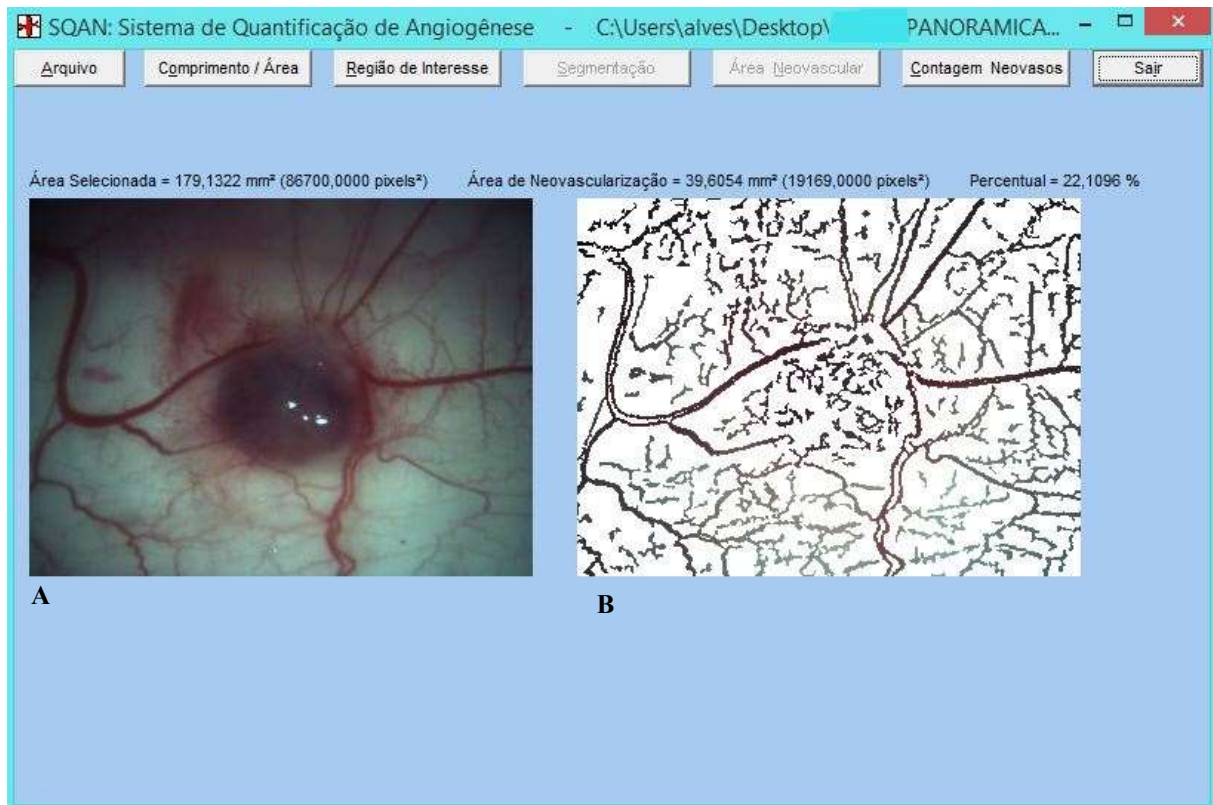
3.8. Eutanásia

Realizado eutanásia por aprofundamento da dose anestésica após retirada da bolsa jugal.

3.9 Quantificação da angiogênese

As imagens capturadas por microscópio estereoscópico foram avaliadas pelo sistema de quantificação da angiogênese (SQAN-versão 1.00-2005), desenvolvido especificamente com a finalidade de quantificar a angiogênese (FECHINE -JAMACARU, 2006). A figura 14 apresenta o ambiente do sistema.

Figura 14- Ambiente do Sistema de Quantificação da Angiogênese –SQAN (FECHINE -JAMACARU, 2006) A - microfotografia estereoscópica panorâmica do implante B- área de neovascularização.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

O programa reconhece e segmenta de forma automática os vasos, separando-os dos demais componentes da imagem. Todavia, uma segmentação interativa é também disponibilizada, a fim de proporcionar uma nova definição de parâmetros de segmentação, caso o pesquisador julgue como inadequado o resultado do procedimento automático. Concluído o processo de segmentação, o sistema disponibiliza os parâmetros de quantificação de angiogênese: área de neovascularização, comprimento vascular total e número de vasos sanguíneos. A resposta neovascular foi então quantificada na imagem panorâmica no aumento de 16x (uma imagem panorâmica de cada bolsa jugal por animal). Todas as imagens avaliadas pelo sistema estão no apêndice A.

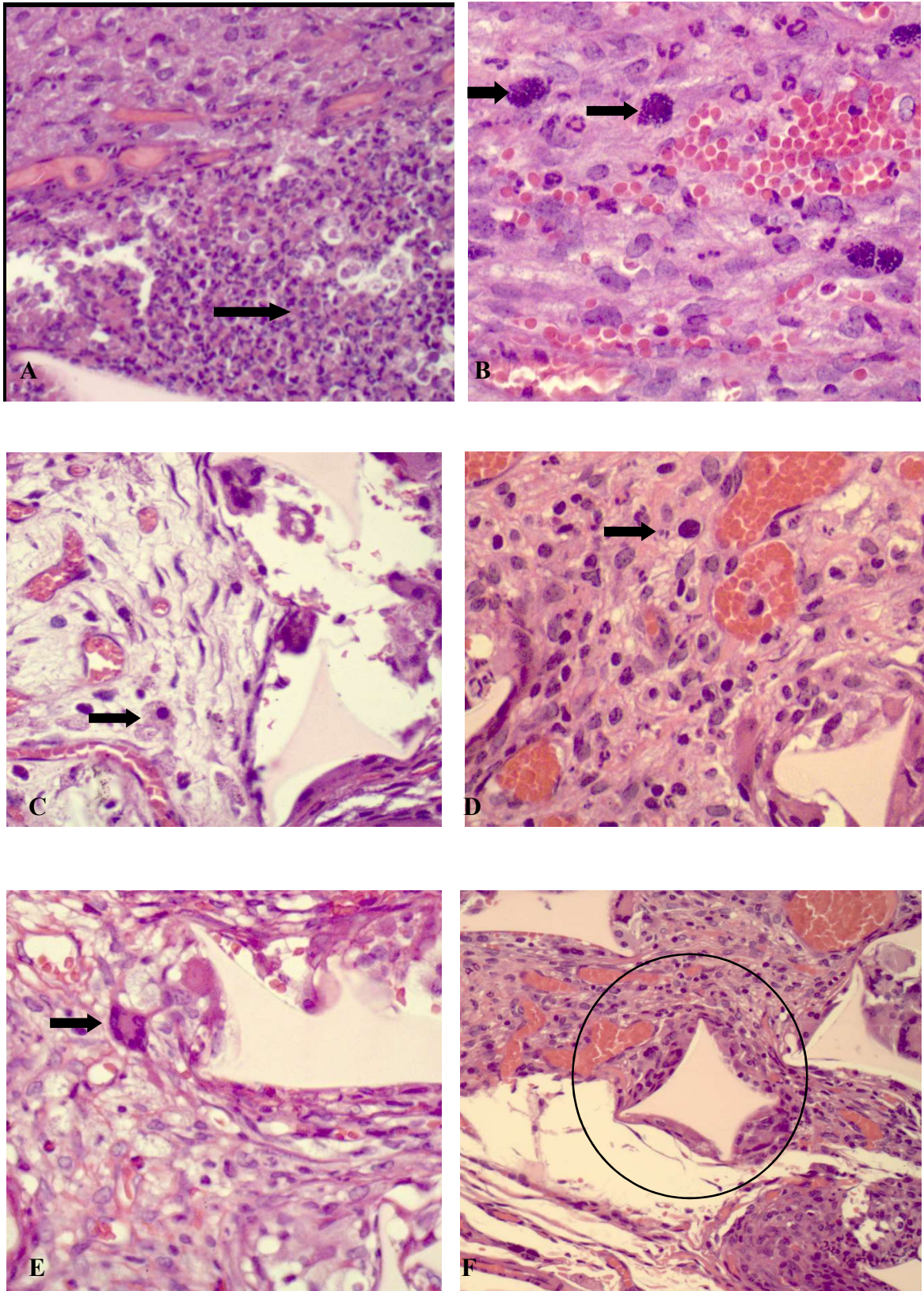
3.10 Estudo histológico

Os cortes (dois cortes para cada animal) da bolsa jugal foram então colocados em cassetes e introduzidos em cestos de processador automático histotécnico, seguindo as seguintes etapas de processamento: desidratados com álcool graduados a 70%, 95% (2 vezes), 100% (3 vezes), tempo mínimo de uma hora cada, diafanizados com xilol (3 vezes), mínimo de 2 horas cada, e impregnados em parafina fundida a 60° (3 vezes), duas horas cada. Uma vez impregnados, os tecidos foram colocados em pequenos recipientes contendo parafina fundida. Em temperatura ambiente, a parafina solidificou-se formando blocos com tecido. Os blocos foram fixados em micrótomo rotativo convencional, para cortes na espessura de 5 µm. Esses cortes colocados em superfície de banho-maria (3 a 8°) foram delicadamente distendidos e colocados sob lâmina e estes encaminhados para estufa a 60°C. Após o período de 1 hora, os cortes foram então levados para desparafinar e hidratar na seguinte sequência: xilol 1, 2 e 3 (por 5, 2 e 1 minuto, respectivamente), seguido de álcool a 100%, 95% e 70% (1 minuto em cada mergulho), e por último lavado em água corrente por 2 minutos. O tecido, uma vez desparafinado e hidratado, foi então levado para corar pela hematoxilina de carazzi por 1 minuto, lavado em água, seguindo-se de eosina, a seguir montada com lamínula, uma gota de bálsamo do Canadá, sobre tecido corado.

3.11 Avaliação histológica microscópica

Na avaliação microscópica da inflamação foram observados os seguintes achados inflamatórios: microabcesso (figura 15), mastócito (figura 16), macrófago (figura 17), linfócito (figura 18), célula gigante (figura 19), granuloma de corpo estranho (figura 20) e fibrose (figura 21), sendo determinados escores (análise qualitativa), que se relacionam a ausência e presença, sendo atribuídos valores: 0 para ausência, 2 presença leve, 3 presença moderada e 4 para presença acentuada (vide apêndice B e C). Realizada análise quantitativa por meio da contagem dos achados em 10 campos no aumento de 400x.

Figura 15 - Microfotografia de cortes histológicos de diferentes implantes de esponja em mucosa jugal sendo identificado por setas (Hematoxilina Eosina 400x de aumento) A – microabscessos. B – Mastócitos. C – Macrófagos. D - Linfócitos. E- Célula gigante. F - Granuloma de corpo estranho (círculo preto) (200x).



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

3.12 Análise estatística

As variáveis quantitativas contínuas e discretas foram estudadas por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov para analisar a normalidade da distribuição. Para a estatística descritiva, foi calculado a média e o desvio padrão (dados paramétricos) ou a mediana, intervalo interquartil e valores mínimo e máximo (dados não paramétricos). Em cada braço do estudo (prevenção + tratamento e tratamento), comparações entre os quatro grupos foram realizadas através da análise de variância para um fator, associada ao teste de comparações múltiplas de Tukey, para verificação de diferenças entre os grupos aos pares ou do teste de Kruskal-Wallis complementado pelo teste de comparações múltiplas de Dunn (variáveis não paramétricas).

Foram empregados testes bicaudais, determinando o nível de significância, considerando estatisticamente significativo um valor p menor que 0,05. Para a realização dos procedimentos estatísticos e para a elaboração dos gráficos foi utilizado o software GraphPad Prism versão 5.00 (GraphPad Software, San Diego, California, USA).

Para avaliação qualitativa da inflamação, o teste t de Student ou Anova foi utilizado, seguido do teste de Bonferroni para comparar os grupos associado ao teste de comparações múltiplas de Fisher ou quiquadrado de Pearson, sendo expressos em forma de frequência absoluta e percentual.

Para avaliação quantitativa da inflamação, as contagens foram submetidas ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov, expressos em forma de média e erro-padrão da média e comparados por meio do teste t de Student ou ANOVA, seguido do pós-teste de Bonferroni (dados paramétricos).

A análise foi realizada usando o software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versão 20,0 para Windows adotando uma confiança de 95% para todas as análises.

4 RESULTADOS

Este estudo se desenvolveu em três etapas.

A primeira fase da pesquisa constituiu-se em desenvolver um modelo animal experimental para estudo da angiogênese inflamatória, por meio de implante de esponja na bolsa jugal de hamster, durante um período de onze dias, onde os grupos foram organizados em: grupos de prevenção + tratamento e grupos de tratamento.

A segunda fase da pesquisa destinou-se a avaliação da quantificação da angiogênese, realizada por um software especialmente para este fim.

A terceira fase da pesquisa destinou-se a avaliação dos processos histopatológicos da inflamação, por meio de cortes histológicos da bolsa jugal, corados em hematoxilina eosina, analisados de forma qualitativa (método de escores) e quantitativa.

4.1 Evolução clínica e mortalidade

Os 48 animais evoluíram bem clinicamente durante todo o experimento, eventualmente apresentavam lesões na pele decorrentes do estresse entre os próprios animais. As lesões foram tratadas com antisséptico tópico (Povidine[®]), a fim de evitar contaminação nos mesmos. Não houve mortalidade durante todo o experimento. Os animais não apresentaram variação brusca de peso, na média de pesos semanais (apêndice D). A dosagem das substâncias administradas, não apresentou variação brusca, tendo em vista sua correlação com o peso animal.

A tabela de consumo das substâncias, própolis vermelha, celecoxibe e goma arábica PA a 1 %, encontra-se no apêndice E.

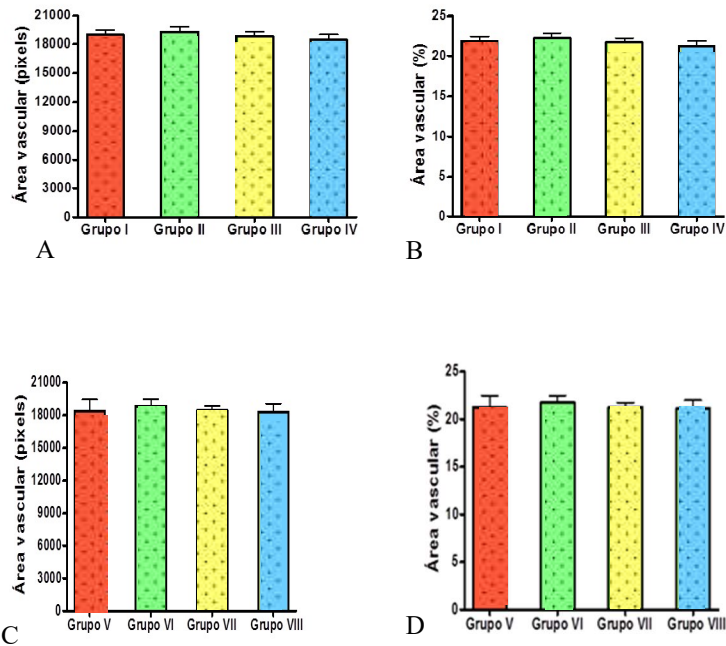
Apesar das vantagens e características teciduais da bolsa jugal já citadas, foram observadas algumas complicações como sítio experimental no presente trabalho, tais como: extrusão da esponja, presença de pus no coxim de implante da esponja, lesões ulceradas, infiltração, aderência em alguns animais dos grupos: I, III, V, VI, VII e VIII,

Após o processamento das imagens pelo sistema SQAN foi possível quantificar a angiogênese em todos os grupos experimentais. A tabela de área de neovascularização encontra-se no apêndice F.

4.2 Quantificação da angiogênese

Não ocorreu significância estatística na comparação entre os grupos I, II III IV (prevenção+ tratamento) nem entre os grupos V, VI VII e VIII (tratamento) (figura 16) Apêndice G e H.

Figura 16- Quantificação da angiogênese pelo SQAN



Legenda: ■ Própolis Vermelha ■ Celecoxibe ■ Goma arábica ■ Água

A) Avaliação da angiogênese nos grupos I, II, III e IV, expressa em pixels. Não foram verificadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($F = 2,6712$; $p = 0,0752$). B) Avaliação da angiogênese nos grupos I, II, III e IV, expressa em termos percentuais. Não foram verificadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($F = 2,6711$; $p = 0,0752$). C) Avaliação da angiogênese nos grupos V, VI, VII e VIII, expressa em pixels. Não foram verificadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($F = 0,6255$; $p = 0,6069$). D) Avaliação da angiogênese nos grupos V, VI, VII e VIII, expressa em termos percentuais. Não foram verificadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($F = 0,6255$; $p = 0,6069$).

4.3 Análise qualitativa da inflamação por meio de escores

4.3.1 Prevenção + Tratamento (Grupos: I Própolis Vermelha, II Celecoxibe, III Goma arábica e IV Água).

Não houve diferença significativa nos achados histológicos: microbcesso ($p = 0,407$), macrófagos ($p = 0,299$), linfócitos ($p = 0,268$), células gigantes ($p = 0,210$), granuloma de corpo estranho ($p = 0,210$) e fibrose ($p = 0,469$) na comparação entre os grupos I, II, III e IV. No entanto, os grupos I e II apresentaram maior frequência de amostras com mastócitos ausentes (redução na presença de mastócitos) em relação ao grupo controle que recebeu água ($p = 0,013$), enquanto que os grupos III e IV apresentaram maior frequência de animais com infiltrado de mastócitos moderado (33,3%) e leve (83,3%) respectivamente (tabela 1).

Tabela 1: Avaliação da inflamação dos grupos I, II, III e IV (própolis vermelha, celecoxibe, goma arábica e água respectivamente), por meio da determinação de escores, expressa em termos percentuais.

	Grupo				p-Valor
	I	II	III	IV	
Microabcesso					
Ausente	66,7%	100,0%	66,7%	66,7%	0,407
Leve	0%	0%	0%	16,7%	
Moderado	0%	0%	16,7%	16,7%	
Acentuado	33,3%	0%	16,7%	0%	
Mastócito					
Ausente	*66,7%	*100,0%	50,0%	0%	0,013
Leve	16,7%	0%	16,7%	83,3%	
Moderado	16,7%	0%	33,3%	16,7%	
Macrófago					
Ausente	33,3%	50,0%	16,7%	0%	0,299
Leve	16,7%	0%	16,7%	0%	
Moderado	0%	16,7%	33,3%	66,7%	
Acentuado	50,0%	33,3%	33,3%	33,3%	
Linfócito					
Ausente	33,3%	50,0%	16,7%	0%	0,268
Leve	66,7%	16,7%	66,7%	66,7%	
Moderado	0%	33,3%	16,7%	33,3%	
Células gigantes					
Ausente	50,0%	50,0%	33,3%	16,7%	0,210
Leve	33,3%	0%	33,3%	0%	
Moderado	16,7%	50,0%	33,3%	83,3%	
Granuloma de corpo estranho					
Ausente	50,0%	50,0%	33,3%	16,7%	0,210
Leve	33,3%	0%	33,3%	0%	
Moderado	16,7%	50,0%	33,3%	83,3%	
Fibrose					
Ausente	33,3%	50,0%	16,7%	0%	0,469
Leve	33,3%	33,3%	33,3%	33,3%	
Moderado	0%	16,7%	33,3%	50,0%	
Acentuado	33,3%	0%	16,7%	16,7%	

Na comparação entre os grupos I (própolis vermelha) e III (goma arábica) não houve diferença estatística significativa nos achados histológicos; microabcesso ($p = 0,513$), mastócito ($p = 0,788$), macrófagos ($p = 0,469$), linfócitos ($p = 0,513$), células gigantes ($p = 0,766$), granuloma de corpo estranho ($p = 0,766$) e fibrose ($p = 0,446$) (Apêndice H).

4.3.2 Tratamento (Grupos: V Própolis Vermelha, VI Celecoxibe, VII Goma arábica e VIII Água)

Na comparação entre os grupos, não houve diferenças estatísticas significantes nos achados histológicos; microabcesso ($p = 0,677$), mastócito ($p = 0,877$), macrófagos ($p = 0,863$), linfócitos ($p = 0,918$), células gigantes ($p = 0,212$), granuloma de corpo estranho ($p = 0,439$) e fibrose ($p = 0,608$) (tabela 2).

Tabela 2: Avaliação da inflamação V, VI, VII e VIII (própolis vermelha, celecoxibe, goma arábica e água respectivamente), por meio da determinação de escores, expressa em termos percentuais.

	Grupo				<i>p</i> -Valor
	V	VI	VII	VIII	
Microabcesso					
Ausente	83,3%	83,3%	83,3%	83,3%	0,677
Moderado	0%	0%	16,7%	0%	
Acentuado	16,7%	16,7%	0%	16,7%	
Mastócito					
Ausente	66,7%	66,7%	50,0%	50,0%	0,877
Leve	33,3%	33,3%	50,0%	50,0%	
Macrófago					
Ausente	66,7%	50,0%	50,0%	50,0%	0,863
Leve	16,7%	0%	16,7%	16,7%	
Moderado	16,7%	33,3%	33,3%	33,3%	
Acentuado	0%	16,7%	0%	0%	
Linfócito					
Ausente	66,7%	50,0%	50,0%	50,0%	0,918
Leve	33,3%	50,0%	50,0%	50,0%	
Células gigantes					
Ausente	83,3%	50,0%	50,0%	50,0%	0,212
Leve	16,7%	0%	0%	33,3%	
Moderado	0%	50,0%	50,0%	16,7%	
Granuloma de corpo estranho					
Ausente	83,3%	50,0%	50,0%	50,0%	0,439
Leve	16,7%	0%	0%	16,7%	
Moderado	0%	50,0%	50,0%	33,3%	
Fibrose					
Ausente	66,7%	66,7%	50,0%	50,0%	0,608
Leve	16,7%	33,3%	50,0%	50,0%	
Acentuado	16,7%	0%	0%	0%	

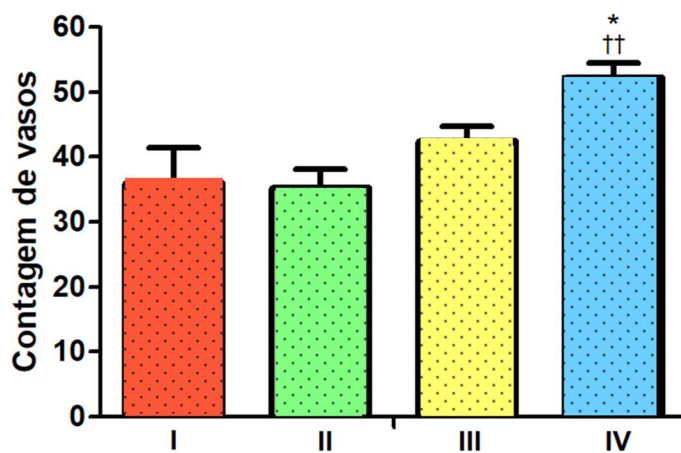
Na comparação entre os grupos V (própolis vermelha) e VII (goma arábica) não houve diferença estatística significativa nos achados histológicos; microabcesso ($p = 0,368$), mastócito ($p = 1,000$), macrófagos ($p = 0,788$), linfócitos ($p = 1,000$), células gigantes ($p = 0,105$), granuloma de corpo estranho ($p = 0,105$) e fibrose ($p = 0,343$) (apêndice I).

4.4 Análise quantitativa da inflamação

4.4.1 Prevenção + Tratamento (Grupos: I Própolis Vermelha, II Celecoxibe, III Goma arábica e IV Água).

Em relação ao número de vasos sanguíneos, na comparação entre os grupos, aqueles tratados com própolis vermelha e celecoxibe foram significativamente menores ($p = 0,007$) que o grupo controle tratado com água. Não houve diferença significativa nos grupos tratados com goma arábica e água (Figura 17).

Figura 17– Número de vasos sanguíneos dos grupos I, II, III e IV.



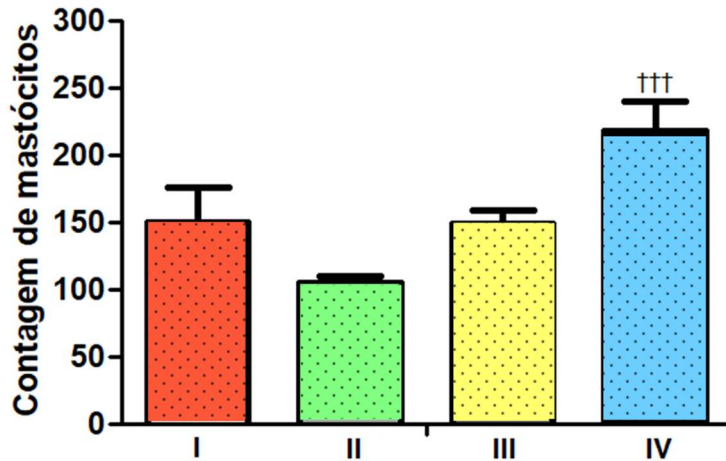
Legenda: ■ Própolis Vermelha ■ Celecoxibe ■ Goma arábica ■ Água

* $p < 0,05$ comparado com o grupo I;

†† $p < 0,01$ comparado com o grupo II.

Em relação ao número de mastócitos, na comparação entre os grupos, aquele tratado com celecoxibe, foi significativamente menor ($p = 0,002$), que o grupo tratado com água. Não houve diferença significativa nos grupos tratados com própolis vermelha, goma arábica e água (figura 18).

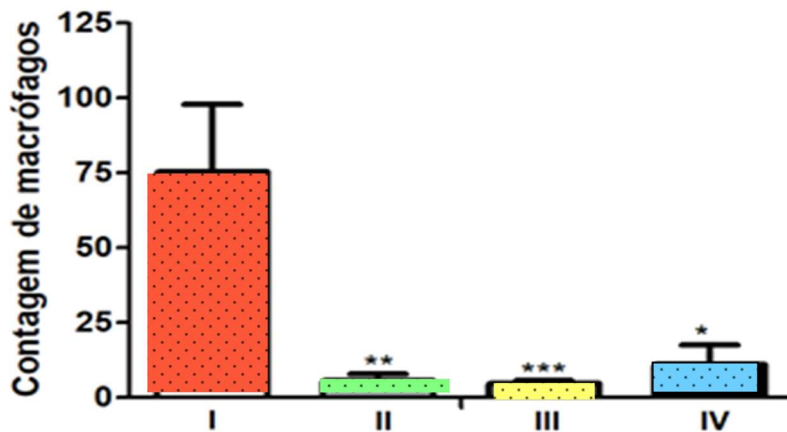
Figura 18– Número de mastócitos dos grupos I, II, III e IV.



Legenda: ■ Própolis Vermelha ■ Celecoxibe ■ Goma arábica ■ Água
 ††† $p < 0,05$ comparado com o grupo II.

Em relação ao número de macrófagos, na comparação entre os grupos, o grupo tratado com celecoxibe, goma arábica e água foram significativamente menores ($p = 0,001$), que o grupo tratado com própolis vermelha (figura 19).

Figura 19– Número de macrófagos dos grupos I, II, III e IV.



Legenda: ■ Própolis Vermelha ■ Celecoxibe ■ Goma arábica ■ Água
 * $p < 0,05$ comparado com o grupo I; ** $p < 0,01$ comparado com grupo I; *** $p < 0,001$ comparado com grupo I.

A tabela 3 consolida os resultados apresentados.

Tabela 3: Avaliação quantitativa da inflamação dos grupos I, II, III e IV (própolis vermelha, celecoxibe, goma arábica e água respectivamente), expressa em média e erro-padrão da média.

	Grupo				p-Valor
	I	II	III	IV	
Vasos	36,0±5,4	35,3±2,8	42,5±2,3	52,3±2,2*††	0,007
Mastócitos	149,7±25,9	104,3±5,0	149,2±9,5	217,7±22,0†††	0,002
Macrófagos	75,5±22,5	5,8±2,2**	4,8±0,8***	11,0±6,4**	0,001
Linfócitos	245,0±43,6	287,5±27,9	245,7±22,5	262,0±18,5	0,720
Células gigantes	5,7±4,7	4,8±1,8	1,2±0,6	12,2±3,2	0,103

Legenda:

* $p < 0,05$ comparado com o grupo I;

** $p < 0,05$ comparado com o grupo I;

*** $p < 0,05$ comparado com o grupo I;

† $p < 0,05$ comparado com o grupo II;

†† $p < 0,05$ comparado com o grupo II;

††† $p < 0,05$ comparado com o grupo II;

‡ $p < 0,05$ comparado com o grupo III;

‡‡ $p < 0,05$ comparado com o grupo III;

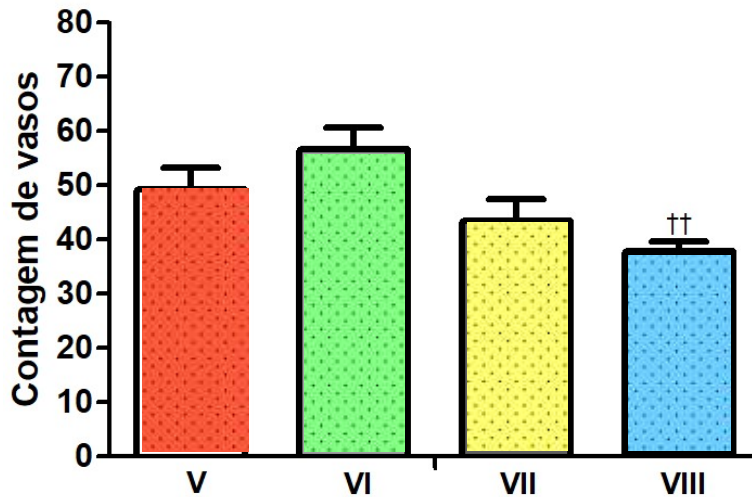
‡‡‡ $p < 0,05$ comparado com o grupo III;

Na comparação entre os grupos I e III (própolis vermelha e goma arábica respectivamente), não houve diferença significativa em relação ao número de vasos ($p = 0,305$), mastócitos ($p = 0,986$), linfócitos ($p = 0,989$) ou células gigantes ($p = 0,363$). No entanto, o grupo I apresentou maior número de macrófagos que o grupo III ($p = 0,026$) (apêndice J).

4.4.2 Tratamento (Grupo V-própolis vermelha, VI-celecoxibe, VII-goma arábica, VIII-água).

Em relação ao número de vasos sanguíneos, na comparação entre os grupos, os grupos tratados com própolis vermelha, goma arábica e água foram significativamente menores que o grupo tratado com celecoxibe ($p = 0,008$) (figura 20).

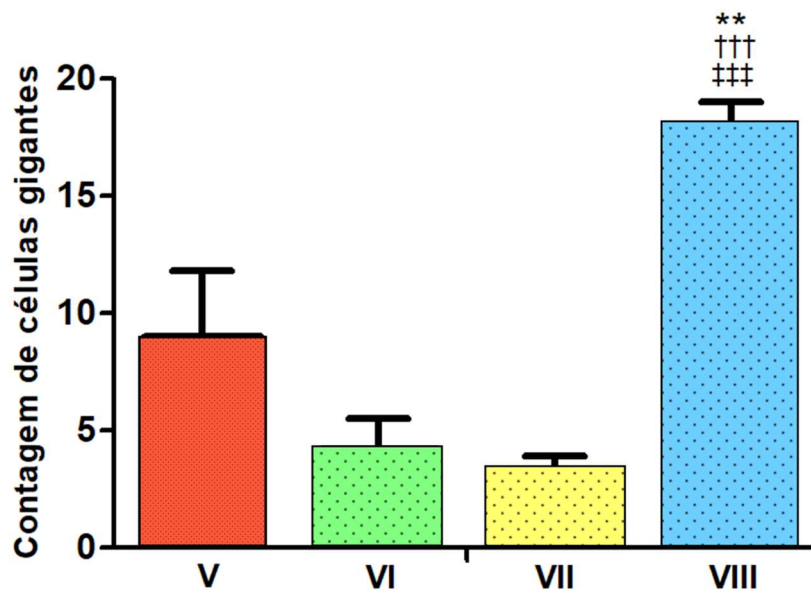
Figura 20– Número dos vasos sanguíneos dos grupos V, VI, VII e VIII.



Legenda: ■ Própolis Vermelha ■ Celecoxibe ■ Goma arábica ■ Água
 †† $p < 0,05$ comparado com o grupo VI;

Em relação ao número de células gigantes, na comparação entre os grupos, aqueles tratados com própolis vermelha, celecoxibe e goma arábica foram significativamente menores ($p = < 0,001$) que o grupo tratado com água (figura 21).

Figura 21– Número de células gigantes dos grupos V, VI, VII e VIII.



Legenda: ■ Própolis Vermelha ■ Celecoxibe ■ Goma arábica ■ Água

** $p < 0,05$ comparado com o grupo V;
 ††† $p < 0,05$ comparado com o grupo VI;
 ‡‡‡ $p < 0,05$ comparado com o grupo VII;

A tabela 4 consolida os resultados apresentados.

Tabela 4: Avaliação quantitativa da inflamação dos grupos V, VI, VII e VIII (própolis vermelha, celecoxibe, goma arábica e água respectivamente), expressa em média e erro-padrão da média.

	Grupos				<i>p</i> -Valor
	V	VI	VII	VIII	
Vasos	49,2±4,0	56,7±3,9	43,5±3,9	37,8±1,9 ^{††}	0,008
Mastócitos	259,7±17,0	286,8±10,4	317,3±17,6	203,3±65,3	0,165
Macrófagos	18,8±4,8	23,3±2,2	26,7±1,9	26,0±8,4	0,690
Linfócitos	306,8±17,6	269,5±19,4	297,0±17,7	186,8±59,5	0,079
Células gigantes	9,0±2,8	4,2±1,3	3,2±0,7	18,0±1,0 ^{**†††‡‡‡}	<0,001

Legenda:

* $p < 0,05$ comparado com o grupo V;
 ** $p < 0,05$ comparado com o grupo V;
 *** $p < 0,05$ comparado com o grupo V;
 † $p < 0,05$ comparado com o grupo VI;
 †† $p < 0,05$ comparado com o grupo VI;
 ††† $p < 0,05$ comparado com o grupo VI;
 ‡ $p < 0,05$ comparado com o grupo VII;
 ‡‡ $p < 0,05$ comparado com o grupo VII;
 ‡‡‡ $p < 0,05$ comparado com o grupo VII;

Na comparação entre os grupos V e VII (própolis vermelha e goma arábica respectivamente), não houve diferença significativa entre o número de vasos ($p = 0,330$), macrófagos ($p = 0,161$), linfócitos ($p = 0,702$) e células gigantes ($p = 0,093$). No entanto, o número de mastócitos foi significativamente superior no grupo VII ($p = 0,041$), conforme demonstra a tabela no apêndice L.

5 DISCUSSÃO

Implantes de matrizes sintéticas, como a esponja, permitem o estudo de diversos componentes dos processos inflamatórios e angiogênicos (MENDES *et al.*, 2009). Além dos estudos sobre a angiogênese inflamatória, é crescente o interesse no uso de implantes também nas pesquisas relacionadas a engenharia de tecidos, uma vez que a biocompatibilidade, a angiogênese e o processo inflamatório estão diretamente relacionados (CASSINI-VIEIRA *et al.*, 2015).

O estudo da angiogênese inflamatória induzida por implante de esponja em bolsa jugal utiliza como ferramenta um modelo novo e reproduzível para avaliação de angiogênese e inflamação. A abordagem experimental utilizada no presente trabalho criou um modelo simulando uma condição clínica de reação inflamatória decorrente da presença de um corpo estranho (esponja) implantado na bolsa jugal de hamster, permitindo, assim, estudar a angiogênese inflamatória.

O hamster apresenta na bolsa jugal um local de fácil acesso, por meio da eversão da bolsa sem sofrimento para o animal. As paredes epiteliais da bolsa são translúcidas, facilitando a visualização o que possibilita evitar lesões dos vasos e um possível contato antigênico por via sanguínea. Após ser colocada de volta na cavidade bucal, a parede da bolsa jugal acomoda enxertos protegendo-os de traumatismos externos, dispensando o uso de curativos no pós-operatório (HOCHMAN *et al.*, 2003), entretanto podem ocorrer traumatismo devido ao armazenamento de alimentos na região. Devido a propriedade de sítio imunologicamente privilegiado alguns trabalhos já utilizaram implante e/ou inoculação de substâncias e ou microorganismos na bolsa jugal (BEG *et al.*, 2004; ARRUDA; NOGUEIRA; BOURDON, 2002).

Dentro dos objetivos propostos, a viabilidade de um novo modelo de implante de esponja em um sítio de difícil acesso cirúrgico e imunologicamente privilegiado foi um grande desafio e dentro do desafio a concretização da idéia foi totalmente possível durante a constituição do piloto. Na verdade ele foi superado no momento que a dissecação cirúrgica foi instituída por descolamento delicado hidráulico a partir de pequeno volume padronizado de injeção de solução fisiológica subepitelial. Com a formação da bolha, o leito de implante já estava construído, e daí a abertura de pertuito pequeno com introdução da esponja de tamanho ligeiramente menor, se deu o “nascimento do modelo”. Restava saber sobre o comportamento do corpo estranho naquele novo ambiente. Com os resultados, ficou demonstrado a viabilidade e reprodutibilidade do modelo.

Ocorreram algumas complicações tais como extrusão da esponja, presença de pus no coxim de implante da esponja, lesões ulceradas, infiltração, aderência em alguns animais dos grupos: I, III, V, VI, VII e VIII, (os animais foram excluídos). As complicações observadas no

sítio experimental do presente trabalho possuem como possíveis causas: auto infligida através da mastigação e inerentes ao ato cirúrgico, os animais armazenam alimentos e resíduos na mesma, favorecendo a contaminação do local. Esta era uma complicação esperada, mas não ocorreram em todos os animais. Embeber a esponja com antibióticos talvez possam reduzir essa complicação.

Para o desenvolvimento do projeto inicial do trabalho, foi implementado um piloto, onde os animais foram submetidos ao implante de esponja e a angiogênese era avaliada de forma macroscópica, por meio da observação da bolsa jugal transluminada, dia sim, dia não, o que levou a determinação do período de onze dias para a execução do experimento, uma vez que foi durante esse período de tempo que ocorreram as alterações vasculares na bolsa jugal. No piloto foi feito implante com esponja não absorvível e absorvível, esta última absorvida pelo organismo em até quinze dias, foi descartada, pois dificultaria na padronização do tempo de estímulo inflamatório (corpo estranho) e posterior avaliação da angiogênese inflamatória.

Com o implante da esponja não absorvível, ficou garantida a presença do estímulo inflamatório (corpo estranho) e conseqüentemente possibilitou a avaliação de angiogênese.

No modelo proposto, as substâncias testadas foram administradas por via subcutânea, outra forma possível seria colocar essas substâncias embebidas na esponja antes do implante, o que fica como sugestão para estudos futuros.

Este modelo foi criado com a pretensão de testar novas substâncias com potencial para ações antiinflamatória, inibidora ou estimuladora de angiogênese. O implante de esponja mimetiza o processo inflamatório com todas suas nuances.

A lesão tecidual leva a inflamação aguda com uma cascata de eventos formando um novo tecido na tentativa de reparar a área lesionada. Esse processo começa imediatamente após o trauma tecidual através da liberação de diversos fatores de crescimento e citocinas (WERNER; GROSE, 2003)

As citocinas estimulam a quimiotaxia e extravasamento leucocitário decorrente de processo inflamatório. Elas são produzidas pelos leucócitos e macrófagos, regulando também a reepitelização, remodelação e angiogênese (WERNER; GROSE 2003). O primeiro fator de crescimento que demonstrou ser quimiotático para neutrófilos, monócitos e fibroblastos foi o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF). O fator de crescimento epidérmico (EGF) foi detectado em eosinófilos. O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) foi identificado como o mais importante regulador de vasculogênese, angiogênese e reparo, tendo nos macrófagos os seus principais produtores de VEGF em lesões cutâneas (WERNER; GROSE 2003).

O processo inflamatório estimulado pelo implante da esponja promove alterações vasculares como: vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e aumento na adesão e migração de leucócitos através das paredes dos vasos sanguíneos, sendo os neutrófilos os principais leucócitos na inflamação aguda, que quando ativados produzem as espécies reativas de oxigênio (ERO), conhecidos como radicais livres, seguidos por monócitos, linfócitos e macrófagos, tipos celulares característicos da inflamação crônica, que também produzem radicais livres (KUMAR *et al.*, 2013; WERNER; GROSE, 2003) no presente trabalho, em cortes corados em HE (hematoxilina- eosina) foram observados: neutrófilos, linfócitos, mastócitos, macrófagos e células gigantes, caracterizando a ocorrência do processo inflamatório na bolsa jugal. Nas condições onde a produção de espécies reativas do oxigênio (radicais livres) supera os sistemas de defesa antioxidante, estas em excesso oxidam lipídios da membrana provocando danos aos ácidos nucleicos, o que constitui a base molecular de várias doenças inflamatórias (VELLOSA *et al.*, 2013).

Compreendendo a relação existente entre angiogênese inflamatória, produção de espécies reativas de oxigênio através das células inflamatórias, se faz necessária a pesquisa de substâncias com valor antioxidante, as mesmas combatem o estresse oxidativo, que é a etiopatogenia de diversas doenças de cunho inflamatório (FREIRES; ALENCAR; ROSALEN, 2016).

A utilização da própolis vermelha neste estudo justifica-se pelo amplo espectro de propriedades biológicas da própolis já conhecidas: antioxidante, anti-inflamatória, imunomodulatórias, entre outras (SFORCIN, 2016).

A tipificação química do extrato de própolis vermelha utilizada neste estudo permitiu o isolamento dos compostos: 2'-hidroxi-4',7-dimetoxiisoflavona, 2',7-dihidroxi-4'-metoxiisoflavona, 2',4'-dihidroxi-7-metoxiisoflavona, 4',7-dihidroxi-2'-metoxiisoflavona, 2',4',4-trihidroxichalcona e lup-20(29)-en-3-ol. A própolis vermelha também foi submetida ao teste de atividade antioxidante obtendo valores próximos ao da atividade antioxidante dos controles de vitamina C e trolox e uma significativa atividade anticolinesterase (AGUIAR *et al.*, 2018). Os flavonoides: neovestitol e vestitol são os responsáveis por conferir a atividade anti-inflamatória e antioxidante proporcionada pela própolis vermelha (BUENO-SILVA *et al.*, 2013; MENDONÇA *et al.*, 2015).

O primeiro estudo sobre própolis e angiogênese inflamatória foi publicado em 1999, sugerindo ação anti-inflamatória da própolis por inibição da ciclooxigenase e lipooxigenase (HEPSEN; ER; CEKIÇ, 1999). Um outro estudo sugere que a atividade antiangiogênica da própolis também seja responsável pelo efeito anti-inflamatório da mesma (SONG *et al.*, 2002). Há relato na literatura de inibição da angiogênese pela própolis verde (DORNELAS *et al.*,

2012).

No trabalho foi utilizada a dose de 100 mg/kg de própolis vermelha, dosagem que já descrita na literatura, apresenta efeitos antitumorais, modulando a formação, diferenciação e progressão de tumores (RIBEIRO *et al.*, 2015; PINHEIRO *et al.*, 2014), o que culmina na atividade inibidora de angiogênese por meio da própolis, uma vez que já é conhecido que a angiogênese é fundamental para a progressão de neoplasias (EICHHORN *et al.*, 2007).

A própolis vermelha brasileira administrada por via oral em ratos na forma de extrato hidroalcoólico mostrou sinais de toxicidade, tais como: sonolência, sibilância, diminuição de movimentos, tremores e diarreia, sem levar o animal ao óbito, principalmente em ratos a partir de uma dosagem de 200 mg/kg peso animal (SILVA *et al.*, 2015). No presente trabalho não foram observados nenhum sinal de toxicidade.

Discutindo sobre a quantificação morfométrica (pelo SQAN) da angiogênese, em relação aos grupos que receberam própolis vermelha, não houve redução da angiogênese, comparando com os controles, analisando a área vascular em imagens estereoscópicas panorâmicas da circunvizinhança da esponja, bem como na análise da área vascular média dos quatro quadrantes também não ocorreu diferença significativa, a própolis não foi efetiva para inibição da angiogênese.

Sobre a quantificação morfométrica (pelo SQAN) da angiogênese, em relação aos grupos que receberam celecoxibe, analisando a área vascular em imagens estereoscópicas panorâmicas da circunvizinhança da esponja, o celecoxibe discretamente inibiu a angiogênese, comparando com os controles, não apresentando diferença estatística significativa. Na análise da área vascular média dos quatro quadrantes o celecoxibe não apresentou diferença significativa, o celecoxibe não foi efetivo para inibição da angiogênese.

Sobre a quantificação morfométrica (pelo SQAN) da angiogênese, em relação aos grupos que receberam goma arábica, analisando a área vascular em imagens estereoscópicas panorâmicas da circunvizinhança da esponja, comparando com os grupos controles, não houve redução da angiogênese, bem como na análise da área vascular média dos quatro quadrantes também não ocorreu diferença significativa. A goma arábica PA a 1% não foi efetiva para inibição da angiogênese.

A goma arábica, também conhecida como goma de acácia (GAS) é proveniente da planta Acácia Senegal, consiste em um extrato em pó natural obtido mecanicamente dessa árvore, possuindo importante atividade oxidante (KADDAM *et al.*, 2017). Estas são produzidas por plantas com a finalidade de cobrir ferimentos existentes nos troncos de árvores, protegendo de microorganismos. Antigamente era usada na mumificação dos faraós, atualmente é muito

utilizada na indústria alimentícia em produtos, tais como gomas, pastilhas, marshmallows e caramelos (FIB, 2011). A administração da própolis extraída em goma arábica PA a 1% é demonstrada em vários trabalhos (BHADAURIA; NIRALA; SHUKLA, 2007; BHADAURIA; NIRALA; SHUKLA, 2008; BHADAURIA, 2012). Como a própolis vermelha foi extraída em goma arábica PA a 1%, estabeleceu-se um grupo de controle, ao qual foi administrado solução de goma arábica PA a 1%.

Considerando a angiogênese foram realizados estudos com avaliação morfométrica e estudos quantitativos e qualitativos, em lâminas coradas pelo HE, onde discutindo sob os aspectos da inflamação, a contagem de vasos não foi avaliada de forma qualitativa pelo método de escores, empregado para os outros achados histológicos. Na avaliação quantitativa houve uma diminuição no número de vasos sanguíneos, no grupo que foi tratado com própolis vermelha de forma preventiva apresentando uma redução significativa em relação ao grupo controle da água, caracterizando inibição da angiogênese. Esse efeito inibitório é descrito na literatura onde a própolis vermelha inibiu a angiogênese inflamatória relacionada a aterosclerose em ratos *knockout* para o receptor de LDL (DALEPRANE *et al.*, 2012).

Na análise morfométrica a própolis não apresentou significância estatística na inibição da angiogênese. Importante reconhecer que no 11º dia temos formação de um pseudoencapsulamento da esponja (fibrose) deixando a angiogênese restrita intraesponja. Desta forma o SQAN neste caso não se prestaria para esta análise fora da esponja já que ele avalia a angiogênese periesponja. É preciso lembrar que o estudo morfométrico quantifica vasos pela microscopia estereoscópica (16x) e a quantificação pelo HE é pela microscopia ótica (400x), que são parâmetros diferentes de análise. Desta forma estamos falando de microvasculatura e os nossos resultados de significância estão neste cenário.

Em um estudo sobre cicatrização, o uso de membranas de colágeno contendo extrato de própolis vermelha, sugere que a incorporação do extrato não parece ter influenciado o padrão de evolução cicatricial a ponto de interferir no valor médio do perímetro dos vasos capilares residuais (BARRETO, 2008).

É importante salientar, em se tratando de própolis, que outras variáveis como: tipo de extração, que pode não ser tão eficiente já que a própolis não é solúvel em água; diferentes extrações podem ter diferentes compostos bioativos, dose, tempo, tipo de angiogênese (se neoplásica ou inflamatória) (FISCHER *et al.*, 2008) podem influenciar o resultado.

Nossos resultados de significância estatística de inibição da angiogênese com própolis

favorece o pensamento de que a própolis possa ter uma ação imunomoduladora, que tem influenciado ora estimulando, ora inibindo eventos imunológicos, o que se explica pela variedade de compostos que constitui sua complexidade química ainda pouco estudada, bem como os diversos métodos de extração existentes e outras substâncias como o óxido nítrico (NO) e espécies reativas do oxigênio (FISCHER *et al.*, 2008).

Atualmente, o uso da própolis como uma substância imunomoduladora tem sido considerada, por reduzir quadros inflamatórios em doenças como candidíase (KHOSRAVI *et al.*, 2014) e leishmaniose (SANTOS *et al.*, 2017).

Essa modulação imunológica se evidencia no trabalho quando de forma qualitativa foram verificados uma redução significativa no tocante a mastócitos nos grupos tratados com própolis vermelha em relação ao grupo controle que recebeu água ($p = 0,013$), nos grupos de prevenção + tratamento. Também podemos inferir esta reflexão na forma quantitativa, onde o grupo tratado com celecoxibe apresentou significância em relação ao grupo controle que recebeu água ($p = 0,002$) nos grupos de prevenção + tratamento.

Os mastócitos são derivados de células progenitoras hematopoiéticas na medula óssea (LEVICK; WIDIDAPRADJA, 2018) e são fundamentais no desenvolvimento de doenças inflamatórias, uma vez que atuam alterando a permeabilidade vascular, através da liberação de mediadores vasoativos e recrutando células inflamatórias (ROBUFFO *et al.*, 2017), sendo essenciais na inflamação aguda (CRUVINEL *et al.*, 2010) e na inflamação crônica (SANTOS *et al.*, 2010).

Essa diminuição já é relatada na literatura, em trabalho que avalia o efeito da própolis sobre mastócitos na cicatrização de feridas na cavidade bucal em hamsters (BARROSO *et al.*, 2012). A relação entre mastócitos e a vasculatura e o aumento dessas células na inflamação são acompanhadas de angiogênese (CORREIA; MEDRADO, 2013).

Com essa redução sugere-se o mecanismo de ação inibitória da inflamação e angiogênese própolis vermelha pelo mastócito neste estudo.

Decorrente da ação de mediadores produzidos por mastócitos ocorre o recrutamento de macrófagos para o local de lesão tecidual visando o reparo (BARRETO, 2008). Os macrófagos, com sua função fagocítica predominam na inflamação crônica, a permanência do agente lesivo, no caso o implante da esponja (agente físico) leva à cronificação do processo inflamatório, a presença dos macrófagos e de angiogênese ratificam a cronicidade dessa inflamação, uma vez que os próprios macrófagos liberam citocinas inflamatórias ampliando a duração do evento inflamatório (CRUVINEL *et al.*, 2010).

No trabalho foi verificado que o número de macrófagos foi significativamente maior no

grupo tratado com própolis vermelha (prevenção +tratamento) que nos demais grupos (celecoxibe, goma arábica e água) ($p = 0,001$).

Esse aumento no número de macrófagos no grupo tratado com própolis vermelha é conhecido. A própolis promove a ativação de macrófagos, desempenhando um papel fundamental na defesa do organismo, através da fagocitose, geração de radicais livres, mediação de processos inflamatórios e secreção de uma variedade de substâncias diferentes, como enzimas, citocinas e componentes do sistema complemento; também pode ser observado o incremento das respostas imunes celular e humoral. A ação da própolis sobre os macrófagos resulta em aumento da capacidade fagocítica (FISCHER *et al.*, 2008) e aumento da atividade tumoricida dos macrófagos (ORSOLIC; BASIC, 2005).

Com a cronificação do processo inflamatório é notável a presença das células gigantes, que consistem no agrupamento de macrófagos e que podem se desenvolver em resposta a agentes com baixa atividade imunológica, como ocorre em matérias não absorvíveis (BARBIERI *et al.*, 2017). O grupo que recebeu própolis vermelha apenas no tratamento, apresentando ($p = < 0,001$) apresentou diferença significativa no número de células gigantes em relação ao grupo controle que recebeu água sugerindo atividade anti-inflamatória por parte da própolis vermelha.

Em relação ao número de vasos sanguíneos houve uma redução no grupo do celecoxibe que foi administrado (prevenção+tratamento) em relação ao grupo controle (que recebeu água) ($p = 0,007$), exercendo atividade inibidora de angiogênese; quando administrado apenas no tratamento foi verificada um aumento no número dos vasos quando comparado ao grupo controle que recebeu água ($p = 0,008$), exercendo atividade estimuladora da angiogênese. O celecoxibe pode apresentar propriedades estimuladoras de angiogênese (XU; GAO; SHU, 2011). Nanopartículas de celecoxibe induziram uma vascularização significativa do miocárdio isquêmico (MARGULIS *et al.*, 2015), possibilitando uma outra importante aplicação. Mesmo conhecido como inibidor de angiogênese, o celecoxibe não inibiu angiogênese inflamatória (JAMACARU, 2006) e angiogênese tumoral (DORNELAS *et al.*, 2012).

Na análise morfológica, o celecoxibe reduziu de forma discreta a angiogênese e sem significância estatística. O celecoxibe que é um inibidor da COX-2, é conhecido como inibidor de angiogênese, como por exemplo no câncer colorretal (GHANGHAS *et al.*, 2016) na retinopatia (LIU; CHEN; CAI, 2015). Talvez as variáveis como dose e tempo de experimento não foram adequadas para apresentar resultados estatísticos significantes como já relatados na literatura. Seriam diferentes mecanismos de ação (dos efeitos aparentemente contraditórios de estimular e inibir a angiogênese)?

Qualitativamente, em relação ao número de mastócitos houve uma redução significativa em relação ao grupo controle que recebeu água ($p = 0,013$) quando celecoxibe foi administrado de forma preventiva o que se confirmou na análise quantitativa, onde houve uma redução significativa em relação ao controle que recebeu água ($p = 0,002$). Essa redução de mastócitos observada no grupo do celecoxibe vai ao encontro da literatura, uma vez que o celecoxibe apresenta efeito imunomodulatório (CHIBA *et al.*, 2012).

O grupo controle que recebeu celecoxibe ($p = < 0, 001$) apenas no tratamento apresentou diferença significativa na contagem de células gigantes em relação ao controle que recebeu água, indicando atividade anti-inflamatória do celecoxibe. Diferença essa também verificada na número de células gigantes no grupo que recebeu goma arábica ($p = < 0, 001$) apenas no tratamento comparado com o grupo controle que recebeu água, sugerindo atividade anti-inflamatória da goma.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos apontam que a própolis vermelha não inibiu a angiogênese na dose e tempo estabelecido pelo desenho experimental no tocante a quantificação da angiogênese morfométrica.

Ao exame histológico de inflamação em bolsa jugal de hamster, a própolis vermelha apresentou atividade imunomoduladora, reduzindo a população de mastócitos quando administrada de forma preventiva e continuada na análise qualitativa. A própolis vermelha aumentou a população de macrófagos, quando administrada de forma preventiva. Na contagem de vasos sanguíneos, quando a própolis vermelha foi administrada de forma preventiva, houve redução na contagem dos vasos sanguíneos. Estes resultados caracterizam a atividade inibidora de angiogênese, atividade anti-inflamatória, antioxidante e imunomoduladora da própolis vermelha.

Mais estudos são necessários, tanto *in vivo* como *in vitro*, para estabelecer os mecanismos de ação da própolis vermelha, tornando-a uma aliada no tratamento de doenças em que a angiogênese inflamatória se faz presente.

7 CONCLUSÃO

A própolis vermelha inibiu a angiogênese inflamatória quando administrada prévia e continuamente após o implante.

O modelo experimental de implante de esponja na bolsa jugal de hamster foi criado com sucesso

A quantificação morfométrica SQAN em microscopia estereoscópica de vasos em bolsa jugal de hamster no tempo de 11 dias não se presta para análise deste modelo.

A própolis vermelha exerceu efeitos imunomodulatórios em células inflamatórias (mastócitos e macrófagos).

REFERÊNCIAS

- AGAPIDOU, A. *et al.* The Role of Angiogenesis in Haemophilic Arthropathy: Where Do We Stand and Where Are We Going? **Turk J Haematol**.v. 33, n. 2, p.88-93, jun. 2016.
- AGUIAR, G. R.*et al.* Estudo Quimico e Avaliacao Biologica da Propolis Vermelha de Alagoas. **Revista Virtual De Química**. V.10, n.1,2018.
- ALKIM, C. *et al.* Angiogenesis in Inflammatory Bowel Disease. **Int J Inflamm**.v. 2015, p.1-10, dez. 2015.
- ALMEIDA, E.B.*et al.* The incorporation of Brazilian propolis into collagen-based dressing films improves dermal burn healing. **J Ethnopharmacol**.v. 147, n. 2, p.419-425, mai. 2013.
- ALONSO, D.C. *et al.* Anestesia de hamsters (*Mesocricetus auratus*) com tiletamina-zolazepam em associação ou não com a levomepromazina. **Revista Ceres**. v. 54, n. 311, p.7-13, jan./fev. 2007.
- APPELBERG, R. **As células fagocíticas**.IN C. AVEVEDO. Biologia Celular e molecular. Lisboa, LIDEL:pp. 491-502. 2005.
- ANDRADE, S. P.; FERREIRA, M.A. The Sponge Implant Model of Angiogenesis. **Methods Mol Biol**. v. 467, p.295-304, 2009.
- ANDRADE, S.P.; FERREIRA, M.A. The Sponge Implant Model of Angiogenesis. **Methods Mol Biol**.v.1430, p.333-343, 2016.
- ANDRADE, S.P.; FAN, T.P.; LEWIS, G.P. Quantitative in-vivo studies on angiogenesis in a rat sponge model. **Br J Exp Path**.v. 68, n. 6, p.755-766, dez. 1987.
- ARICI, A. *et al.* Interleukin-8 expression and modulation in human preovulatory follicles and ovarian cells. **Endocrinology**.v. 137, n. 9, p.3762-3769, set. 1996.
- ARROYO, A. G.; IRUELA-ARISPE, M. L. Extracellular matrix, inflammation, and the angiogenic response. **Cardiovascular Res**.v. 86, n. 2, p.226-235, mai. 2010.
- ARRUDA, M.S.P.; NOGUEIRA, M.E.S.; BORDON, A.P. Histological evaluation of the lesion induced by inoculation of *Leishmania mexicana* in the cheek pouch of the hamster. **Rev Soc Bras Med Trop**. v. 35, n. 4, p.293-297, jul. /ago. 2002.
- AUSPRUNK, D.H.; FOLKMAN, J. Migration and proliferation of endothelial cells in performed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. **Microvasc Res**.v.14,

n. 1, p.53-65, jul.1977.

BABUKUMAR, S. *et al.* Molecular effects of hesperetin, a citrus flavanone on 7, and 12-dimethylbenz (a) anthracene induced buccal pouch squamous cell carcinoma in golden Syrian hamsters. **Arch Physiol Biochem.** v.123, n.4, p. 265-278, mai. 2017.

BALLERMANN, B.J.; OBEIDAT, M. Tipping the balance from angiogenesis to fibrosis in CKD. **Kidney Int Suppl.**v. 4, n. 1, p.45-52, nov. 2014.

BALLY, M. *et al.* Risk of acute myocardial infarction with NSAIDs in real world use: bayesian meta-analysis of individual patient data. **BMJ.**p.1909, mai. 2017.

BARBARIC, M. *et al.* Chemical composition of the ethanolic propolis extracts and its effect on HeLa cells. **J Ethnopharmacol.**v. 135, n. 3, p.772-778, jun. 2011.

BARBIERI, R.L. *et al.* Stem cells hematopoietic niches and inflammatory response to different synthetic prosthesis implanted in rat with incisional hernias. **Arq Bras Cir Dig.**v.30, n.2, p.108-113, 2017.

BARBOSA, R.A. *et al.* Hydroalcoholic extract of red propolis promotes functional recovery and axon repair after sciatic nerve injury in rats. **Pharm Biol.** v. 54, n. 6, p.993-1004, out. 2016.

BARKER, C.F.; BILLINGHAM, R.E. Immunologically privileged sites. **Adv Immunol.** v. 25, p.1-54, 1977.

BARRETO, A.L.S. **Estudo histomorfológico do efeito de membranas de colágeno contendo própolis vermelha sobre o processo de reparo cicatricial por segunda intenção em ratos.** Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente) –Universidade Tiradentes, Aracaju, 2008.

BARROSO, P.R. *et al.* Effect of propolis on mast cells in wound healing. **Inflammopharmacology.**v.20, n.5, p.289-94, 2012.

BEG, M.A. *et al.* An experimental model for amoebic abscess production in the cheek pouch of the Syrian golden hamster, *Mesocricetus auratus*. **Parasitol Int.**v. 53, n. 3, p.247-254, set. 2004.

BEGNINI, K.R. *et al.* Brazilian Red Propolis Induces Apoptosis-Like Cell Death and Decreases Migration Potential in Bladder Cancer Cells. **Evid Based Complement Alternat Med.**v. 2014, p.1-13, 2014.

BEHL, T.; KOTWANI, A. Potential of angiotensin II receptor blockers in the treatment of diabetic retinopathy. **Life Sci.**v. 176, p.1-9, mai. 2017.

BERGMAN, B.; BERGMAN, M.; HELANDER, H. Appearance of surfaces of dental amalgam in contact with gold. An in vivo study. **Acta Odontol Scand.**v. 40, n. 5, p.325-332, 1982.

BHADAURIA, M. *et al.* Hepatic endogenous defense potential of propolis after mercury intoxication. **Integr Zool.**v. 3, n. 4, p.311-321, dez. 2008.

BHADAURIA, M. Propolis Prevents Hepatorenal Injury Induced by Chronic Exposure to Carbon Tetrachloride. **Evid Based Complement Alternat Med.**v. 2012, p.1-12, 2012.

BHADAURIA, M.; NIRALA, S.K. Reversal of acetaminophen induced subchronic hepatorenal injury by propolis extract in rats. **Environ Toxicol Pharmacol.** v. 27, n. 1, p.17-25, jan. 2009.

BHADAURIA, M.; NIRALA, S.K.; SHUKLA, S. Multiple treatment of propolis extract ameliorates carbon tetrachloride induced liver injury in rats. **Food Chem Toxicol.**v. 46, n. 8, p.2703-2712, ago. 2008.

BHADAURIA, M.; NIRALA, S.K.; SHUKLA, S. Propolis protects CYP 2E1 enzymatic activity and oxidative stress induced by carbon tetrachloride. **Mol Cell Biochem.**v. 302, n. 1-2, p.215-224, ago. 2007.

BHADAURIA, M.; NIRALA, SK; SHUKLA, S. Duration-Dependent Hepatoprotective Effects of Propolis Extract Against Carbon Tetrachloride–Induced Acute Liver Damage in Rats, **Adv Ther.**v.24,n.5,p.1136-1145,set./out.2007.

BEZERRA, G.B. *et al.* Hydroalcoholic extract of Brazilian red propolis exerts protective effects on acetic acid-induced ulcerative colitis in a rodent model. **Biomed & Pharmacother.**v. 85, p.687-696, jan. 2017.

BIJOVSKY, A.T.; MILDNER, R.V. Ultrastructural analysis of the interaction between host cells and *Trypanosoma cruzi* in experimental chagomas. **Trans R Soc Of Trop Med Hyg.**v. 82, n. 5, p.704-708, 1988.

BLOBAUM, A.L.; MARNETT, L.J. Structural and Functional Basis of Cyclooxygenase Inhibition. **J Med Chem.** v. 50, n. 7, p.1425-1441, abr. 2007.

BRIZZOLARA, A. *et al.* The ErbB family and androgen receptor signaling are targets of Celecoxib in prostate cancer. **Cancer Lett.** v. 400, p.9-17, ago. 2017.

BOLETIM BRASILEIRO DE AVALIAÇÃO DE TECNOLOGIAS EM SAÚDE -BRATS: INIBIDORES DA ANGIOGÊNESE PARA O TRATAMENTO DA DEGENERAÇÃO MACULAR RELACIONADA A IDADE.v.3, n.6, dez.2008.

BUENO-SILVA, B. *et al.* Effect of neovestitol–vestitol containing Brazilian red propolis on accumulation of biofilmin vitroand development of dental caries in vivo. **Biofouling**. v. 29, n. 10, p.1233-1242, 2013.

BUENO-SILVA, B. *et al.* Anti-Inflammatory and Antimicrobial Evaluation of Neovestitol and Vestitol Isolated from Brazilian Red Propolis. **J Agric Food Chem**.v. 61, n. 19, p.4546-4550, mai.2013.

BUENO-SILVA, B. *et al.* Brazilian Red Propolis Attenuates Inflammatory Signaling Cascade in LPS-Activated Macrophages. **Plos One**. v. 10, n. 12, p.144954, dez. 2015.

BULANT, C.A. *et al.* Computer-aided quantification of microvascular networks: Application to alterations due to pathological angiogenesis in the hamster. **Microvasc Res**.v. 112, p.53-64, jul. 2017.

BURIOL, L. *et al.* Composição química e atividade biológica de extrato oleoso de própolis: uma alternativa ao extrato etanólico. **Química Nova**.v. 32, n. 2, p.296-302, 2009.

CALDER, P.C. *et al.* Inflammatory Disease Processes and Interactions with Nutrition. **Br J Nutr**.v. 101, n. 1, p.1-45, mai 2009.

CAMARÉ, C. *et al.* Angiogenesis in the atherosclerotic plaque. **Redox Biol**. v. 12, p.18-34, ago. 2017.

CAMPOS, P.P. *et al.* Cellular proliferation, differentiation and apoptosis in polyether-polyurethane sponge implant model. **Hist Histopathol**.n.12, p.1263-1270, dez. 2006.

CARMELIET, P. Angiogenesis in health and disease. **Nat Med**.v. 9, n. 6, p.653-660, jun. 2003.

CARMELIET, P. Angiogenesis in life, disease and medicine. **Nature**. v. 438, n. 7070, p.932-936,dez. 2005.

CASTRO, P.R. *et al.* Kinetics of implant-induced inflammatory angiogenesis in abdominal muscle wall in mice. **Microvasc Res**.v. 84, n. 1, p.9-15, jul. 2012.

CASSINI-VIEIRA P.*et al.* iNOS Activity Modulates Inflammation, Angiogenesis, and Tissue Fibrosis in Polyether-Polyurethane Synthetic Implants. **Mediators Inflamm.** p.. 138461, 2015.

CELEBRA: Celecoxibe 200 mg. Responsável técnico Carolina C. S. Rizoli. Laboratório Pfizer, 2016. Bula de remédio. Disponível em: <http://www.pfizer.com.br/sites/g/files/g10027021/f/product_attachments/Celebra.pdf>. Acesso em :11/06/2017.

CELESTE, J.L.L. *et al.* Experimental mixed infection of Leishmania (Leishmania) amazonensis and Leishmania (L.) infantum in hamsters (Mesocricetus auratus). **Parasitology.**v. 144, n.9, p.1191-1202, 2017.

CHAPMAN, K.E. *et al.* Changing glucocorticoid action: 11-Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in acute and chronic inflammation. **J Steroid Biochem Mol Biol.** v. 137, n.100, p.82-92, set. 2013.

CHIBA, A.*et al.* A 4-trifluoromethyl analogue of celecoxib inhibits arthritis by suppressing innate immune cell activation. **Arthritis Res Ther.**v.14, n.1, p.r9, 2012.

CLAIRE, M.C.ST. *et al.* Animal Models of Ebolavirus Infection. **Comp Med.** v. 67, n.3, p. 253-262, jun. 2017.

CONWAY, E.M.; COLLEN, D.; CARMELIET, P. Molecular mechanisms of blood vessel growth. **Cardiovasc Res.** v. 49, n. 3, p.507-521, fev. 2001.

COOKE, R.C. **A Guerra contra o câncer: a revolucionária descoberta da angiogênese e as novas perspectivas para a cura do câncer.** Rio de Janeiro: Objetiva, 2001. Tradução de :Maria Tereza Machado.

CORRÊA, F.R.S. *et al.* Brazilian red propolis improves cutaneous wound healing suppressing inflammation-associated transcription factor NFκB. **Biomed Pharmacother.** v. 86, p.162-171, fev. 2017.

CORREIA, K.V.D; MEDRADO, A.R.A.P.Participação dos mastócitos no reparo tecidual em lesões inflamatórias bucais – uma revisão de literatura.**Revista Bahiana de Odontologia.**v.4, n.1,2013.

COSTA, M.F.B. *et al.* Red propolis ameliorates ischemic-reperfusion acute kidney injury. **Phytomedicine.** v. 22, n. 9, p.787-795, ago. 2015.

CRUVINEL, W.M. *et al.* Sistema imunitário - Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Rev. Bras. Reumatol.** v.50, n.4, p. 434-447, 2010.

DALEPRANE, J.B. *et al.* Anti-atherogenic and anti-angiogenic activities of polyphenols from propolis. **J Nutr Biochem.** v. 23, n. 6, p.557-566, jun. 2012.

DALEPRANE, J.B.; ABDALLA, D.S. Emerging Roles of Propolis: Antioxidant, Cardioprotective, and Antiangiogenic Actions. **Evid Based Complement Alternat Med.** v. 2013, p.1-8, 2013.

DANTAS, R.P.S. *et al.* Antioxidant, antimicrobial, antiparasitic, and cytotoxic properties of various Brazilian própolis extracts. **PLoS One**, v.12, n.3,2017.

DIEGELMANN, R.F. *et al.* Analysis of the effects of chitosan on inflammation, angiogenesis, fibroplasia, and collagen deposition in polyvinyl alcohol sponge implants in rat wounds. **Wound Repair Regen.** v. 4, n. 1, p.48-52, jan. 1996.

DIPIETRO, L.A. Angiogenesis and wound repair: when enough is enough. **Journal Of Leuk Biol.** v. 100, n. 5, p.979-984, nov. 2016.

DORNELAS, C.A, *et al.* Angiogenesis inhibition by green propolis and the angiogenic effect of L-lysine on bladder cancer in rats. **Acta Cir Bras.**v. 27, n. 8, p.529-536, ago. 2012.

DORNELAS, C.A. *et al.* Chemoprevention with green propolis green propolis extracted in L-lysine versus carcinogenesis promotion with L-lysine in N-Butyl-N-[4-hydroxybutyl] nitrosamine (BBN) induced rat bladder cancer. **Acta Cir Bras.**v. 27, n. 2, p.185-192, fev. 2012.

DORNELAS, C.A. *et al.* Potential chemoprotective effects of green propolis, L-lysine and celecoxib on bone marrow cells and peripheral blood lymphocytes of Wistar rats subjected to bladder chemical carcinogenesis. **Acta Cirur Bras.** v. 29, n. 7, p.423-428, jul. 2014.

DVORAK, A.M. *et al.* The vesiculo-vacuolar organelle (VVO): a distinct endothelial cell structure that provides a transe. **J Leucoc Biology.** v. 59, n. 1, p.100-115, jan. 1996.

DVORAK, H.F. Rous-Whipple Award Lecture. How tumors make bad blood vessels and stroma. **Am J Of Pathol.** v. 162, n. 6, p.1747-1757, jun. 2003.

ECHEVERRIA, V. *et al.* Is VEGF a key target of cotinine and other potential therapies against Alzheimer disease? **Curr Alzheimer Res.**v. 14, n. 999, p.1-1, mar. 2017.

EICHHORN, M. E. *et al.* Angiogenesis in cancer: molecular mechanisms, clinical

impact. **Langenbeck's Arch Surg.** v. 392, n. 3, p.371-379, 2007.

EL-SAYED, R. M.; MOUSTAFA, Y. M.; EL-AZAB, M. F. Evening primrose oil and celecoxib inhibited pathological angiogenesis, inflammation, and oxidative stress in adjuvant-induced arthritis: novel role of angiopoietin-1. **Inflammopharmacology.** v. 22, n. 5, p.305-317, out. 2014.

ELSHABRAWY, H.A. *et al.* The pathogenic role of angiogenesis in rheumatoid arthritis. **Angiogenesis.** v. 18, n. 4, p.433-448, jul. 2015.

ESPINOSA, R.R. *et al.* Antioxidant activity of phenolic compounds added to a functional emulsion containing omega-3 fatty acids and plant sterol esters. **Food Chem.**v. 182, p.95-104, set. 2015.

FAIRWEATHER, M. *et al.* Celecoxib inhibits early cutaneous wound healing. **J Surg Res.**v. 194, n. 2, p.717-724, abr. 2015.

FAN, L.W. *et al.* Celecoxib attenuates systemic lipopolysaccharide-induced brain inflammation and white matter injury in the neonatal rats. **Neuroscience.**v. 240, p.27-38, jun. 2013.

FANG, Y. *et al.* Ethanol extract of propolis inhibits atherosclerosis in ApoE-knockout mice. **Lipids Health Dis.**v. 12, n. 1, p.12123, 2013.

FECHINE-JAMACARU, F. V. ***In vivo* quantification of corneal angiogenesis using digital image processing.** Tese (Doutorado em Cirurgia) – Departamento de Cirurgia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006. Disponível em: <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/7700>.

FERRARA, N. Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. **Am J Physiol Cell Physiol.**v. 280, n. 6, p.1358-1366, jun .2001.

FERRARA, N.; GERBER, H.P.; LECOUTER, J. The biology of VEGF and its receptors. **Nat Med.**v. 9, n. 6, p.669-676, jun. 2003.

FERRARA, N.; KERBEL, R.S. Angiogenesis as a therapeutic target. **Nature.**v. 438, n. 7070, p.967-974, dez. 2005.

FISCHER, G.*et al.* Imunomodulação pela própolis. **Arq. Inst. Biol.** v. 75, n. 2, p. 247-253, 2008.

FOLKMAN, J. Tumor Angiogenesis: Therapeutic Implications. **N Engl J Med.** v. 285, n. 21, p.1182-1186, nov. 1971.

FOLKMAN, J.; KLAGSBRUN, M. Angiogenic factors. **Science**.v. 235, n. 4784, p.442-447, jan. 1987.

FRANCHI, G.C. *et al.* Comparison of Effects of the Ethanolic Extracts of Brazilian Propolis on Human Leukemic Cells As Assessed with the MTT Assay. **Evid Based Complement Alt Med**.v. 2012, p.1-6, 2012.

FRANCHIN, M.*et al.* Neovestitol, an isoflavonoid isolated from Brazilian red propolis, reduces acute and chronic inflammation: involvement of nitric oxide and IL-6. **Sci Rep**.v. 6, n. 1, p.36401, nov. 2016.

FRANCHIN, M. *et al.* Vestitol Isolated from Brazilian Red Propolis Inhibits Neutrophils Migration in the Inflammatory Process: Elucidation of the Mechanism of Action. **J Nat Prod**. v. 79, n. 4, p.954-960, abr. 2016.

FREIRES, I.A.; ALENCAR, S.M.; ROSALEN, P. L. A pharmacological perspective on the use of Brazilian Red Propolis and its isolated compounds against human diseases. **Eur J Med Chem**.v. 110, p.267-279, mar. 2016.

FOOD INGREDIENTS BRASIL-FIB.Dossiê gomas: As gomas exudadas de plantas.n.17,2011.

GAO, J.H. *et al.* Celecoxib and octreotide synergistically ameliorate portal hypertension via inhibition of angiogenesis in cirrhotic rats. **Angiogenesis**.v. 19, n. 4, p.501-511, jul. 2016.

GHANGHAS, P. *et al.* Chemoprevention of Colon Cancer through Inhibition of Angiogenesis and Induction of Apoptosis by Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs. **J Environ Pathol Toxicol Oncol**.v. 35, n. 3, p.273-289, 2016.

GRENHO, L. *et al.* In vitro antimicrobial activity and biocompatibility of propolis containing nanohydroxyapatite. **Biomed Mat**.v. 10, n. 2, p.025004, mar. 2015.

GRINDLAY, J.H.; WAUGH, J.M. Plastic sponge which acts as a framework for living tissue. **AMA Arch Surg**. v. 63, n. 3, p.288-297, set. 1951.

GUO, L. *et al.* Linking Hemorrhage, Angiogenesis, Macrophages, and Iron Metabolism in Atherosclerotic Vascular Diseases. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. v. 37, n. 4, p.33-39, mar. 2017.

HARDY, M.H. *et al.* The development of the syrian hamster cheek pouch. **Anat Rec**.v. 214, n. 3, p.273-282, mar. 1986.

HAWKEY, C.J. COX-2 chronology. **Gut**.v. 54, n. 11, p.1509-1514, nov. 2005.

HEPSEN, IF; ER, H; CEKIÇ, O. Topically applied water extract of propolis to suppress corneal neovascularization in rabbits. **Ophthalmic Res**.v.31,n.6,p.426-31,1999.

HOCHMAN, B. *et al.* Investigação do transplante heterólogo de quelóide na bolsa jugal do hamster (*Mesocricetus auratus*). **Acta Cir Bras**.v. 18, n. 4, p.266-271, ago. 2003.

HOCHMAN, B.*et al.* Integração do enxerto heterólogo de pele humana no subepit lio da bolsa jugal do hamster (*Mesocricetus auratus*). **Acta Cir Bras**, v.18 n.5,2003.

HOSHINO,M;NAKAMURA, Y;QUTAYBA ,A. H. Gene expression of vascular endothelial growth factor and its receptors and angiogenesis in bronchial asthma. **J Allergy Clin Immunol**.v.107, n.6,p.1034-1038,2001.

HOZZEIN, W.N. *et al.* Topical Application of Propolis Enhances Cutaneous Wound Healing by Promoting TGF-Beta/Smad-Mediated Collagen Production in a Streptozotocin-Induced Type I Diabetic Mouse Model. **Cell Physiol Biochem**.v. 37, n. 3, p.940-954, set. 2015.

HUANG, S. *et al.* Recent Advances in the Chemical Composition of Propolis. **Molecules**.v. 19, n. 12, p.19610-19632, nov. 2014.

HURLEY, J.V. **Acute inflammation**. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1972.

H RL, W.H. Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs and the Kidney. **Pharmaceuticals**.v. 3, n. 7, p.2291-2321, jul. 2010.

ILHAN, A. *et al.* Protective effects of caffeic acid phenethyl ester against experimental allergic encephalomyelitis-induced oxidative stress in rats. **Free Rad Biol Med**.v. 37, n. 3, p.386-394, ago. 2004.

INUI, S. *et al.* Identification of the phenolic compounds contributing to antibacterial activity in ethanol extracts of Brazilian red propolis. **Nat Prod Res**.v. 28, n. 16, p.1293-1296, mar.2014.

JACOB, A. *et al.* The effects of Malaysian propolis and Brazilian red propolis on connective tissue fibroblasts in the wound healing process. **Bmc Complement Alternat Med**.v. 15, n. 1, p.294, ago. 2015.

JACOBS, M.M.Trace element inhibition of carcinogenesis and angiogenesis. **Biol Trace Elem Res**.v. 5, n. 4-5, p.375-381, ago. 1983.

JESUS, R.P.; WAITZBERG, D.L.; CAMPOS, F.G. Regenera o hepática: papel dos fatores

de crescimento e nutrientes. **Rev Ass Méd Bras**.v. 46, n. 3, p.242-254, set. 2000.

KADDAM, L.*et al.* Gum Arabic as novel anti-oxidant agent in sickle cell anemia, phase II trial.**BMC Hematol**. v.17, n.4, 2017.

KARAMAN, H. *et al.* Opioids Inhibit Angiogenesis in a Chorioallantoic Membrane Model. **Pain Physician**.v. 20, n. 2, p.11-21, fev. 2017.

KARAMYSHEVA, A F. Mechanisms of angiogenesis. **Biochemistry**.v. 73, n. 7, p.751-62, Jul.2008.

KAWANO, Y. *et al.* Development and Characterization of Oral Spray for Stomatitis Containing Irsogladine Maleate. **Chem Pharm Bull**.v. 64, n. 12, p.1659-1665, 2016.

KHAYYAL, M.T.; EL-HAZEK, R.M.; EL-GHAZALY, M.A. Propolis aqueous extract preserves functional integrity of murine intestinal mucosa after exposure to ionizing radiation. **Environ Toxicol Pharm**.v. 40, n. 3, p.901-906, nov. 2015.

KISMET, K. *et al.* Does propolis have any effect on non-alcoholic fatty liver disease? **Biomed Pharmacother**.v. 90, p.863-871, jun. 2017.

KHOSRAVI, A.R.*et al.* Immunomodulatory efficacy of ethanol extract of propolis on tumor-bearing mice with disseminated candidiasis.**J Mycol Med**.v.24, n.4, p.143-8, 2014.

KONISHI, S. *et al.* Análise da influência de agentes solubilizantes na atividade antimicrobiana de extratos de própolis e de uma formulação de spray hidroalcoólico. **Mensagem Doce**.n. 75, p.22-25, 2004.

KUMAR, V.*et al.* **Patologia básica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p.1048, 2008.

KUMAR,V.*et al.* **Robbins Patologia básica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier,2013.

KUMAR, A. *et al.* Comparison of Plaque Inhibiting Efficacies of Aloe Vera and Propolis Tooth Gels: A Randomized PCR Study. **J Clin Diagn Res**.v.9, n.9, p.01-03, 2015.

KWIATKOWSKI, S. *et al.* A Common Profile of Disordered Angiogenic Factor Production and the Exacerbation of Inflammation in Early Preeclampsia, Late Preeclampsia, and Intrauterine Growth Restriction. **Plos One**.v. 11, n. 10, p.0165060, out. 2016.

LAWRENCE, T.; GILROY, D.W. Chronic inflammation: a failure of resolution? **Int J Exp Pathol**.v. 88, n. 2, p.85-94, abr. 2007.

LEDON, N. *et al.* Antipsoriatic anti-inflammatory and analgesic effects of an extract of red propolis. **Zhongguo Yao Li Xue Bao**.v. 18, n. 3, p.274-276, mai.1997.

LENGFELD, J.; CUTFORTH, T.; AGALLIU, D. The role of angiogenesis in the pathology of multiple sclerosis. **Vasc Cell**.v. 6, n. 1, p.23-26, nov. 2014.

LEONARD, B.E. Inflammation and depression: a causal or coincidental link to the pathophysiology? **Acta Neuropsychiatr**.p.1-16, jan. 2017.

.LEVICK, S.P. ; WIDIAPRADJA, A.Mast Cells: Key Contributors to Cardiac Fibrosis.**Int J Mol Sci**.v.19,n.1,p. e231 ,2018.

LI, Y. *et al.* Transplantation of multipotent Isl1+ cardiac progenitor cells preserves infarcted heart function in mice. **Am J Transl Res**.v. 9, n. 3, p.1530-1542, mar. 2017.

LI, Y. *et al.* Progesterone Alleviates Endometriosis via Inhibition of Uterine Cell Proliferation, Inflammation and and Angiogenesis in an Immunocompetent Mouse Model **Plos One**.v. 11, n. 10, p.0165347, out. 2016.

LIMA, L.D. *et al.* Brazilian green propolis modulates inflammation, angiogenesis and fibrogenesis in intraperitoneal implant in mice. **Bmc Complement Alternat Med**.v. 14, n. 1, p.177, mai.2014.

LINDENBAUM, E.S. *et al.* Uterine angiogenic factor induces vascularization of collagen sponges in guinea-pigs. **Burns**.v. 15, n. 4, p.225-229, 1989.

LINDNER, D.J. Interferons as antiangiogenic agents. **Curr Oncol Rep**.v.4, n. 6 p.510-514,2002.

LIU, N.; CHEN, L.; CAI, N. Celecoxib attenuates retinal angiogenesis in a mouse model of oxygen-induced retinopathy. **Inte J Clin Exp Pathol**.v. 8, n. 5, p.4990-4998, 2015.

LONGO, R. *et al.* Anti-angiogenic therapy: rationale, challenges and clinical studies. **Angiogenesis**.v. 5, n. 4, p.237-256, 2002.

LOPEZ, B.G. *et al.* Antimicrobial and cytotoxic activity of red propolis: an alert for its safe use. **J Appl Microbiol**.v. 119, n. 3, p.677-687, set. 2015.

LU, Y. *et al.* Glucose-6-Phosphate Isomerase (G6PI) Mediates Hypoxia-Induced Angiogenesis in Rheumatoid Arthritis. **Sci Rep**.v. 7, p.4027, jan. 2017.

MACHADO, B.A. *et al.* Chemical Composition and Biological Activity of Extracts Obtained by Supercritical Extraction and Ethanolic Extraction of Brown, Green and Red Propolis Derived from Different Geographic Regions in Brazil. **Plos One**.v. 11, n. 1, p.0145954, jan. 2016.

MACMILLAN, C.J. *et al.* Murine Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Is Diminished by Treatment with the Angiogenesis Inhibitors B20-4.1.1 and Angiostatin (K1-3). **Plos One**.v. 9, n. 2, p.89770, fev. 2014.

MAGALHÃES, E.O. *et al.* Própolis: Estudo da origem do exsudado resinoso vermelho no caule de *Dalbergia ecastophyllum*. **Mensagem Doce**.n. 110, p.10-10, mar. 2011.

MALEK, H.A.; SALEH, D.M. Cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib in a rat model of hindlimb ischemia reperfusion. **Can J Physiol Pharmacol**. v. 87, n. 5, p.353-359, mai.2009.

MANDRACCHIA, D. *et al.* Inulin based micelles loaded with curcumin or celecoxib with effective anti-angiogenic activity. **Eur J Pharm Sci**.v. 93, p.141-146, out. 2016.

MANIMARAN, A.; MANOHARAN, S. Tumor Preventive Efficacy of Emodin in 7, 12-Dimethylbenz[a]Anthracene-Induced Oral Carcinogenesis: a Histopathological and Biochemical Approach. **Pathol Oncol Res**.p.1-11, jan.2017.

MARCUCCI, M.C. Própolis tipificada: um novo caminho para a elaboração de medicamentos de origem natural, contendo este produto apícola. **Fitos**.v. 1, n. 3, p.36-45, 2006.

MARCUCCI, M.C. Propolis brasileiras:um estudo químico associado as suas propriedades biológicas. **Relatório de Atividades do Cnpq**. p.1-1, 1994/1995.

MARGULIS, K. *et al.* Celecoxib Nanoparticles for Therapeutic Angiogenesis. **Acs Nano**.v. 9, n. 9, p.9416-9426, set. 2015.

MARINA, M.E. *et al.* VEGF involvement in psoriasis. **Clujul Med**.v. 88, n. 3, p.247-252, jul. 2015.

MAZHAR, D.; R.; WAXMAN, J. COX and cancer. **QJM**. v. 98, n. 10, p.711-718, 2005.

MCMILLAN, M.D.; COWELL, V.M. Effects of chronic *Candida albicans* in the hamster cheek pouch. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**.v. 74, n. 4, p.492-498, out. 1992.

MELLO, B.C.B.S.; PETRUS, J.C.C.; HUBINGER, M.D. Desempenho do processo de concentração de extratos de própolis por nanofiltração. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, n. 1, p.166-172, jan./mar.2010.

- MENDES, J.B.*et al.* Differential effects of rolipram on chronic subcutaneous inflammatory angiogenesis and on peritoneal adhesion in mice. **Microvasc Res**, v.78, n.3, p. 265-271, dez. 2009.
- MENDONÇA, I.C.G.*et al.* Brazilian red propolis: phytochemical screening, antioxidant activity and effect against cancer cells. **Bmc Complement Alternat Med**.v. 15, n. 1, p.357, out. 2015.
- MENDONÇA, R.J.; COUTINHO-NETTO, J. Aspectos celulares da cicatrização. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 84, n. 3, p.257-262, jul. 2009.
- MENDOZA-VIVEROS, L. *et al.* MiR-132/212 Modulates Seasonal Adaptation and Dendritic Morphology of the Central Circadian Clock. **Cell Rep**.v. 19, n. 3, p.505-520, abr. 2017.
- MENEGHELLI C.*et al.* Southern Brazilian autumnal propolis shows anti-angiogenic activity: an in vitro and in vivo study. **Microvasc Res**.v.88, p.1-11,2013.
- MONTEIRO, E.C.A. *et al.* Os antiinflamatórios não esteroidais (AINEs). **Temas de Reumatologia Clínica**, [s. L.], v. 9, n. 2, p.53-63, maio 2008.
- MOREIRA, L.; ROGAO, M.; ESTEVINHO, L.M. Propólis ao longo da história da humanidade. **O Apicultor Revista de Apicultura**. v. 20, n. 73, p.21-24, 2011.
- MOSSALAYI, M.D. *et al.* Grape polyphenols and propolis mixture inhibits inflammatory mediator release from human leukocytes and reduces clinical scores in experimental arthritis. **Phytomedicine**.v. 21, n. 3, p.290-297, fev. 2014.
- MOURA, S.A. *et al.* Brazilian Green Propolis Inhibits Inflammatory Angiogenesis in a Murine Sponge Model. **Evid Based Complement Alternat Med**.v. 2011, p.1-7, 2011.
- MOUSAVI, S.Y. *et al.* A Randomized, Double-Blind Placebo-Controlled Trial on Effectiveness and Safety of Celecoxib Adjunctive Therapy in Adolescents with Acute Bipolar Mania. **J Child And Adolesc Psychopharmacol**.p.207, abr. 2017.
- MUELLER, M.M. Inflammation and angiogenesis: innate immune cells modulators of tumor vascularization. In: DIETER, Marmé; NORBERT, Fusenig. **Tumor Angiogenesis: Basic Mechanisms and Cancer Therapy**. New York: Springer Berlin Heidelberg, 2008. Cap. 20. p. 351-362.
- NASCIMENTO, TG.*et al.* Polymeric Nanoparticles of Brazilian Red Propolis Extract: Preparation, Characterization, Antioxidant and Leishmanicidal Activity. **Nanoscale Res Lett**.v11, n.1, p.301, 2016.

NEVES, M.V. *et al.* Isoflavone formononetin from red propolis acts as a fungicide against *Candida* sp. **Braz J Microbiol.** v. 47, n. 1, p.159-166, jan. 2016.

NIRALA, S.K. *et al.* Combined effects of gallic acid and propolis on beryllium-induced hepatorenal toxicity. **Integr Zool.**v. 3, n. 3, p.194-207, set. 2008.

NIRALA, S.K.; BHADAURIA, M. Propolis reverses acetaminophen induced acute hepatorenal alterations: A biochemical and histopathological approach. **Arch Pharm Res.**v. 31, n. 4, p.451-461, abr. 2008.

OMAR, R.M. *et al.* Chemical characterisation of Nigerian red propolis and its biological activity against *Trypanosoma Brucei*. **Phytochem Anal.** v. 27, n. 2, p.107-115, mar./abr.2016.

ONUORA, S. Therapy: Celecoxib reduces risk of ulcer bleeding. **Nat Rev Rheumatol.** v. 13, n. 6, p.324, jun.2017.

ORSOLIĆ, N.; BASIĆ, I. Water-soluble derivative of propolis and its polyphenolic compounds enhance tumoricidal activity of macrophages. **J Ethnopharmacol.**v.102, n.1, p.37-45, 2005.

OZER, M.K.; PARLAKPINAR, H.; ACET, A. Reduction of ischemia–reperfusion induced myocardial infarct size in rats by caffeic acid phenethyl ester (CAPE). **Clin Biochem.** v. 37, n. 8, p.702-705, ago. 2004.

.PAPAGEORGIU, N. *et al.* Celecoxib for the treatment of atherosclerosis. **Expert Opin Investig Drugs.**v. 25, n. 5, p.619-633, mar. 2016.

PEREIRA, D.S. *et al.* Histórico e principais usos da própolis apícola. **Agropecuária Científica no Semiárido**, Campina Grande, v. 11, n. 2, p.1-21, abr./ jun. 2015.

PINHEIRO, K.S. *et al.* Modulatory activity of brazilian red propolis on chemically induced dermal carcinogenesis. **Acta Cir Bras.**v. 29, n. 2, p.111-117, fev. 2014.

PINHO, M.S.L. ANGIOGÊNESE: O GATILHO PROLIFERATIVO. **Rev Bras Coloproctol.** v. 25, n. 4, p.396-402, 2005.

PINTO, L.M.A. ; PRADO, N.R.T.; CARVALHO, L.B.Properties, uses and applications of the propolis. **Revista Eletrônica de Farmácia.** V.8,n.3,p.76 - 100, 2011.

PIPPI, B. *et al.* In vitro evaluation of the acquisition of resistance, antifungal activity and synergism of Brazilian red propolis with antifungal drugs on *Candida* spp. **J Appl Microbiol.**lv. 118, n. 4, p.839-850, abr. 2015.

PONTUAL, M.A.B.; MAGINI, R.S. **Plasma rico em plaquetas (PRP) e fatores de**

crescimento: das pesquisas científicas à clínica odontológica.São Paulo, 2004.

PRATS, P.M. *et al.* The therapeutic effects of apigenin and dexamethasone on 5-fluorouracil-induced oral mucositis - a pilot study using a Syrian hamster model. **J Oral Pathol Med.**v. 46, n. 2, p.142-147, fev. 2017.

PUNCHARD, N.A.; WHELAN, C.J.; ADCOCK, I. The Journal of Inflammation. **J Inflamm.** v. 1, n. 1, p.1, set. 2004.

RAO, M.*et al.* Role of cyclooxygenase-2 in the angiogenesis of colorectal cancer. **Int J Colorectal Dis.** v.19,n.1,p.:1-11,2004.

REGUEIRA, M.S.N. *et al.* Seasonal variation of Brazilian red propolis: Antibacterial activity, synergistic effect and phytochemical screening. **Food Chem Toxicol.** v. 107, Part B, p.572-580, mar. 2017.

REZAVAND, N. *et al.* Low Doses of Celecoxib Stimulate Human Endometrium Growth in A Three-Dimensional Culture Model. **Int J Fertil Steril.**v. 7, n. 1, p.7-12, abr. 2013.

RIBATTI, D. *et al.* Angiogenesis in asthma. **Clin Exp Allergy.** v. 39, n. 12, p.1815-1821, dez. 2009.

RIBEIRO, D.R. *et al.* Inhibition of DMBA-induced Oral Squamous Cells Carcinoma Growth by Brazilian Red Propolis in Rodent Model. **Basic Clin Pharmacol Toxicol.**v. 117, n. 2, p.85-95, ago. 2015.

RIBEIRO RODRIGUES , Danielle ; CAVALCANTI,Ricardo Luiz ; CORDEIRO, Juliana. Efeito antitumoral e quimiopreventivo da própolis vermelha em murinos Apiterápicos, quimioprevenção, efeito antitumoral, modelo experimental de carcinogênese perioral.**Novas Edições Acadêmicas**,2016.

RICHARZ, N.A.; BOADA, A.; CARRASCOSA, J.M. Angiogenesis in Dermatology – Insights of Molecular Mechanisms and Latest Developments. **Actas Dermosifiliogr.**v.108, n.6, p.515-523, jul./ago.2017.

RIDIANDRIES, A. *et al.* CC-chemokine class inhibition attenuates pathological angiogenesis while preserving physiological angiogenesis.**Faseb J.** v. 31, n. 3, p.1179-1192, mar. 2017.

RISAU, W. Differentiation of endothelium.**Faseb J.** v. 9, n. 10, p.926-933, jul. 1995.

RISAU, W. Embryonic angiogenesis factors. **Pharmacol Ther.**v. 51, n. 3, p.371-376, jan. 1991.

- ROBUFFO, I, *et al.* Mast cell in innate immunity mediated by proinflammatory and anti-inflammatory IL-1 family members. **J Biol Regul Homeost Agents**.v.31,n.4,p.837-842.2017.
- ROMANA-SOUZA, B.*et al.* Selective inhibition of COX-2 improves cutaneous wound healing of pressure ulcers in mice through reduction of iNOS expression. **Life Sci**. v. 153, p.82-92, maio 2016.
- ROMERO-AROCA, P. *et al.* Diabetic Macular Edema Pathophysiology: Vasogenic versus Inflammatory. **J Diabetes Res**.v. 2016, p.1-17, 2016.
- ROSAS, C. *et al.* Celecoxib decreases growth and angiogenesis and promotes apoptosis in a tumor cell line resistant to chemotherapy. **Biol Res**.v. 47, n. 1, p.27-27, 2014.
- ROSS, A.P. *et al.* Social housing and social isolation: Impact on stress indices and energy balance in male and female Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*). **Physiol Behav**.v. 177, p.264-269, ago. 2017.
- ROY, M.; WISHE, H.I. Establishment of an Improved Implantation Technique for Hamster Mucous Membrane Irritation Testing. **J Dent Res**.v. 65, n. 11, p.1365-1370, 1986.
- SANTOS, A.P.F.T.*et al.* Brazilian propolis promotes immunomodulation on human cells from American Tegumentar Leishmaniasis patients and healthy donors infected with *L. braziliensis*. **Cell Immunol**.v.311, p.22-27,2017.
- SANTOS, P.P.A.*et al.* Relationship between mast cells and T cells in inflammation. **Odon-tol.Clín.-Cient**.v.9, n.3, 2010.
- SAXENA, P. *et al.* Potential of the propolis as storage medium to preserve the viability of cultured human periodontal ligament cells: an in vitro study. **Dent Traumatol**.v. 27, n. 2, p.102-108, abr. 2011.
- SFORCIN, J.M. Biological Properties and Therapeutic Applications of Propolis. **Phytother Res**.v. 30, n. 6, p.894-905, jun.2016.
- SHIN, S.H. *et al.* Caffeic Acid Phenethyl Ester, a Major Component of Propolis, Suppresses High Fat Diet-Induced Obesity through Inhibiting Adipogenesis at the Mitotic Clonal Expansion Stage. **J Agric Food Chem**.v. 62, n. 19, p.4306-4312, mai.2014.
- SHRIHARI, T.G. Dual role of inflammatory mediators in cancer. **Ecancermedicalsecience**.v. 11, p.721, fev. 2017.

- SHUKLA, S.; BHADAURIA, M.; JADON, A. Effect of propolis extract on acute carbon tetrachloride induced hepatotoxicity. **Indian J Exp Biol.** v. 42, n. 10, p.993-997, 2004.
- SILVA, D.B. *et al.* Propolis and swimming in the prevention of atherogenesis and left ventricular hypertrophy in hypercholesterolemic mice. **Braz J Biol.**v. 75, n. 2, p.414-422, mai. 2015.
- SILVA, J.M.; MENDONÇA, P.P.; PARTATA, A.K. ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO-ESTERÓIDES E SUAS PROPRIEDADES GERAIS. **Revista Científica do Itpac.**v. 7, n. 4, p.1-10, out. 2014.
- SILVA, R.O. *et al.* Acute and sub-acute oral toxicity of Brazilian red propolis in rats. **J Ethnopharmacol.**v. 170, p.66-71, jul. 2015.
- SILVA, R.P.D. *et al.* Aplicação de Extrato de Própolis em Produtos Alimentícios:Uma Prospecção Baseada em Documentos de Patentes **Revista Virtual de Química.**v. 8, n. 5, p.1251-1261, 2016.
- SILVA, R.P.D.*et al.*Antioxidant, antimicrobial, antiparasitic, and cytotoxic properties of various Brazilian propolis extracts. **PLoS One.**v.12, n.3,p. e0172585,2017.
- SILVA-CARVALHO, R.; BALTAZAR, F.; ALMEIDA-AGUIAR, C. Propolis: A Complex Natural Product with a Plethora of Biological Activities That Can Be Explored for Drug Development. **Evid Based Complem AlternatMed.**v. 2015, p.1-29, 2015.
- SIQUEIRA, A.B. *et al.* Antifungal activity of propolis against Candida species isolated from cases of chronic periodontitis. **Braz Oral Res.**v. 29, n. 1, p.1-6, 2015.
- SOUZA, M.D. *et al.*N-3 PUFA Induce Microvascular Protective Changes During Ischemia/Reperfusion. **Lipids.**v. 50, n. 1, p.23-37, 26 jan. 2015.
- STATON, C.A.; REED, M.W.; BROWN, N.J. A critical analysis of current in vitro and in vivo angiogenesis assays. **Int JExpPathology.**v. 90, n. 3, p.195-221, 2009.
- SUN, Y.*et al.* Inflammatory signals from photoreceptor modulate pathological retinal angiogenesis via c-Fos. **J Exp Med.**v. 214, n.6, p.1753-176,2017.
- SUZUKI, I.” **A própolis de solução aquosa**”. 2000. Acesso em 11 de Junho de 2017. Disponível em: <http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/58/palestra.htm>.
- SUZUKI, J. *et al.* Current therapies and investigational drugs for peripheral arterial disease. **Hypertens Res.**v. 39, n. 4, p.183-191, 2016.

SYMEONIDIS, N. *et al.* The Effect of Celecoxib Administration on the Healing and Neovascularization of Colonic Anastomosis in Rats. **J Invest Surg.** v. 27, n. 3, p.139-146, 2014.

SONG, Y.S. *et al.* Inhibition of angiogenesis by propolis. **Res.** v.25, n.4, p.500–504, 2002.

TAKEMOTO, J.K. *et al.* Clinical Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Profile of Etoricoxib. **Clin Pharmacokinet.** v. 47, n. 11, p.703-720, 2008.

TELES, F. *et al.* Brazilian Red Propolis Attenuates Hypertension and Renal Damage in 5/6 Renal Ablation Model. **Plos One.** v. 10, n. 1, p.0116535, jan. 2015.

TISCHER, E. *et al.* The Human Gene for Vascular Endothelial Growth Factor. **J Biol Chem.** v. 266, n. 18, p.11947-11954, jun.1991.

TORETI, V.C. *et al.* Recent Progress of Propolis for Its Biological and Chemical Compositions and Its Botanical Origin. **Evid Based Complement Alternat Med** v. 2013, p.1-13, jan. 2013.

TRAINA, G. Mast cells in the brain - Old cells, new target. **J Integr Neurosci.** v.16, n.1, p. S69-S83, 2017.

TREFNA, M. *et al.* The influence of sex and diet on the characteristics of hibernation in Syrian hamsters. **J Comp Physiol B.** v.187, n.5-6, p.725-734, mar. 2017.

VANE, S. J. Aspirin and other anti-inflammatory drugs. **Thorax.** v. 55, n. 90002, p.3-9, out. 2000.

VELLOSA, J.C.R. *et al.* Alterações metabólicas e inflamatórias em condições de estresse oxidativo. **Rev Ciênc Farm Básica Apl,** v.34, n.3, p.305-312, 2013.

WALSH, D.A. *et al.* Sequential development of angiotensin receptors and angiotensin I converting enzyme during angiogenesis in the rat subcutaneous sponge granuloma. **Br J Pharmacol.** v. 120, n. 7, p.1302-1311, mar. 1997.

WANG, D.; DUBOIS, R.N. Immunosuppression associated with chronic inflammation in the tumor microenvironment. **Carcinogenesis.** v. 36, n. 10, p.1085-1093, set. 2015.

WANG, Y. *et al.* Experimental Models in Syrian Golden Hamster Replicate Human Acute Pancreatitis. **Sci Rep.** v. 6, n. 1, p.1-1, jun. 2016.

WARNER, B.M.; SAFRONETZ, D.; KOBINGER, G.P. Syrian Hamsters as a Small Animal

Model for Emerging Infectious Diseases: Advances in Immunologic Methods. **Adv Exp Med Biol.** v.972, p.87-101, 2017.

WERNER, S.; GROSE, R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. **Physiol Rev.** v.83, n.3, p.835-70, 2003.

WHITE, F.H.; GOHARI, K. The ultrastructural morphology of hamster cheek pouch epithelium. **Arch Oral Biol.** v. 26, n. 7, p.563-576, 1981.

WIENER, S.L. *et al.* The mechanism of action of a single dose of methylprednisolone on acute inflammation in vivo. **J Clin Invest.** v. 56, n. 3, p.679-689, set.1975.

WILLIAMS, D.E.; EVANS, D, M.; BLAMEY, R.W. The primary implantation of human tumours to the hamster cheek pouch. **Br J Cancer.** v. 25, n. 3, p.533-537, 1971.

XU, C. *et al.* Efficacy and Safety of Celecoxib Therapy in Osteoarthritis: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. **Medicine.** v. 95, n. 20, p.3585, mai.2016.

XU, K.; GAO, H.; SHU, H.K. Celecoxib Can Induce Vascular Endothelial Growth Factor Expression and Tumor Angiogenesis. **Mol Cancer Ther.** v. 10, n. 1, p.138-147, jan. 2011.

YOO, S.Y.; KWON, S.M. Angiogenesis and Its Therapeutic Opportunities. **Mediators Inflamm.** v. 2013, p.1-11, 2013.

YUE, T.L. *et al.* 2-Methoxyestradiol, an Endogenous Estrogen Metabolite, Induces Apoptosis in Endothelial Cells and Inhibits Angiogenesis: Possible Role for Stress-Activated Protein Kinase Signaling Pathway and Fas Expression. **Mol Pharmacol.** v. 51, n. 6, p.951-962, 1997.

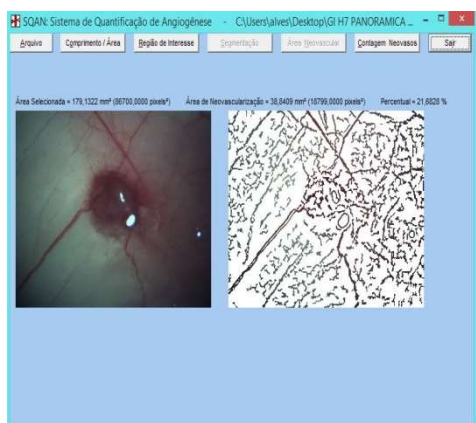
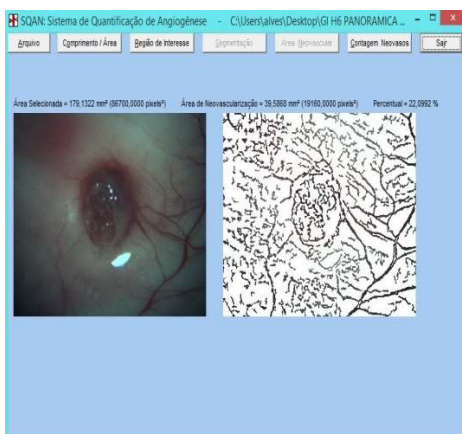
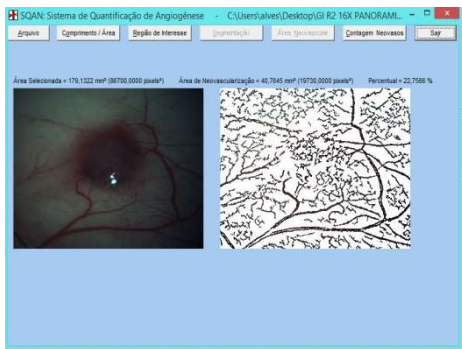
ZETTER, B.R. The scientific contributions of M. Judah Folkman to cancer research. **Nat Rev Cancer.** v. 8, n. 8, p.647-654, jul. 2008.

ZHAO, J.Q. *et al.* Protective effects of propolis on inorganic mercury induced oxidative stress in mice. **Indian J Expe Biol.** v. 47, n. 4, p.264-269, 2009.

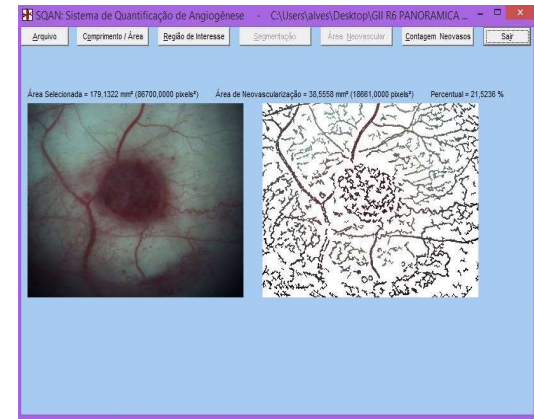
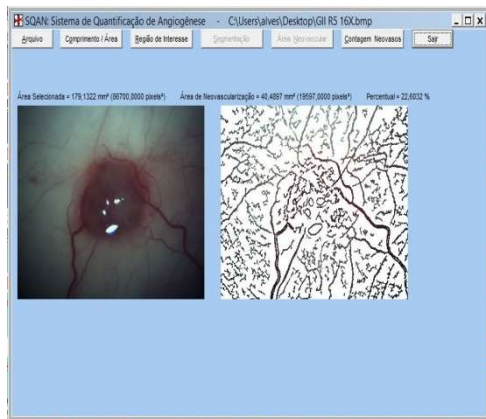
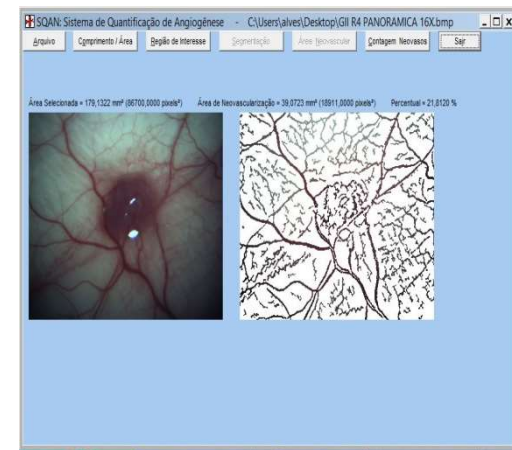
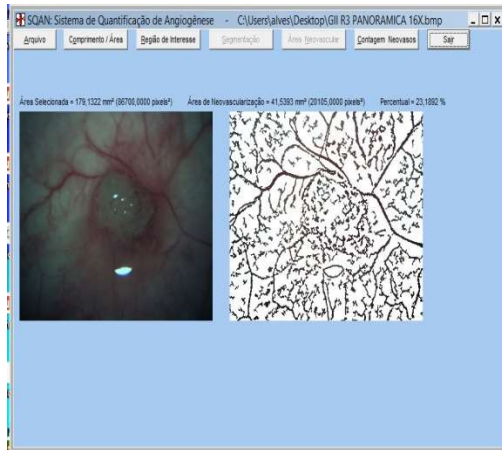
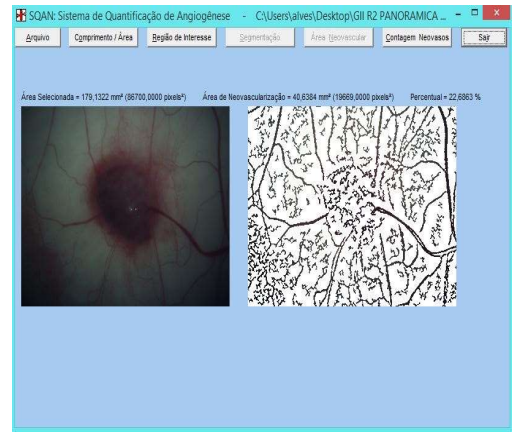
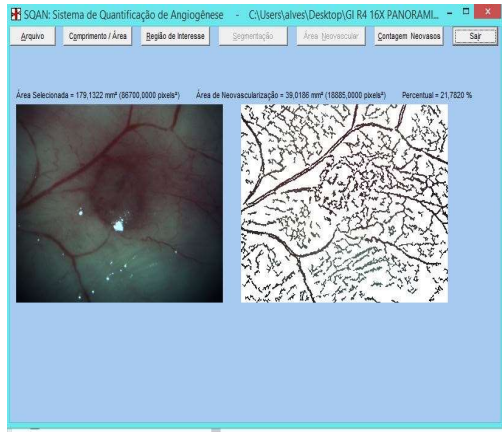
ZHAO, M.J. *et al.* Hypolipidemic effect of XH601 on hamsters of Hyperlipidemia and its potential mechanism. **Lipids Health Dis.** v. 16, n. 1, p.85, mai.2017

APÊNDICE A - MICROFOTOGRAFIAS ESTEREOSCÓPICAS POR GRUPO EXPERIMENTAL NO AMBIENTE DO SISTEMA DE QUANTIFICAÇÃO DE ANGIOGÊNESE SQAN

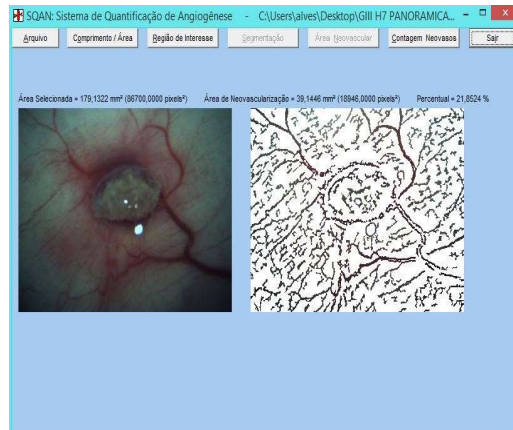
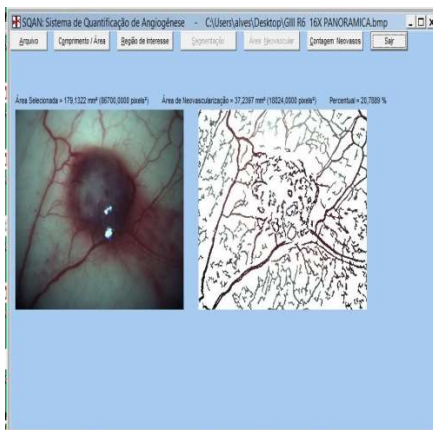
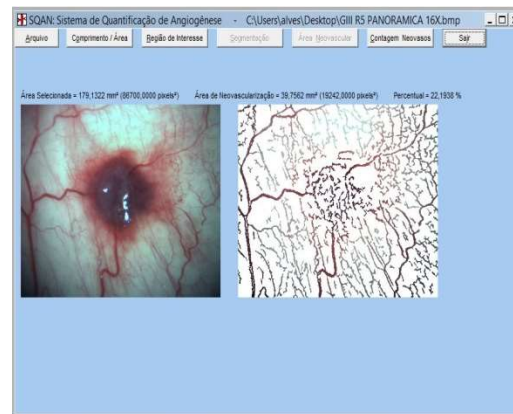
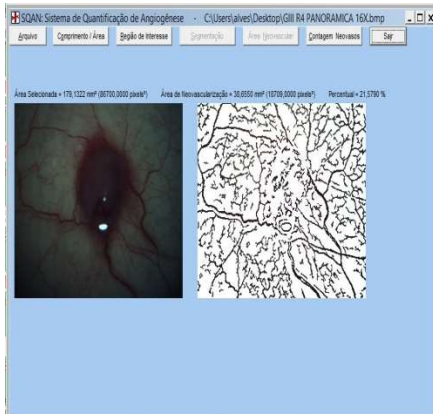
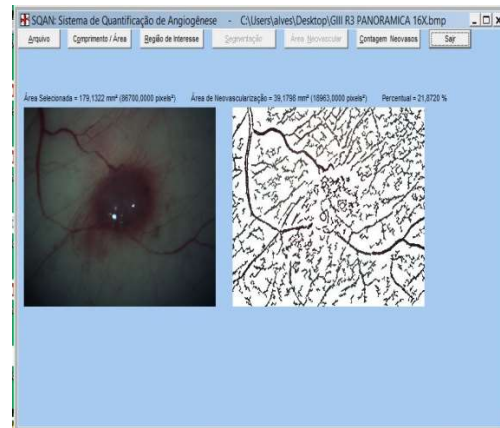
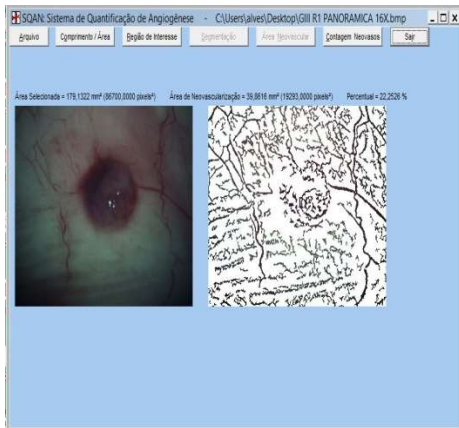
GRUPO I



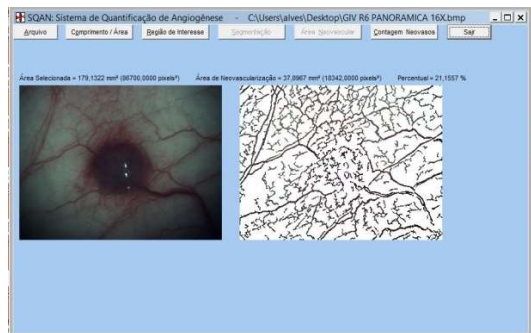
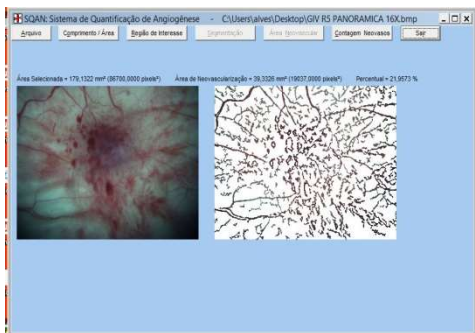
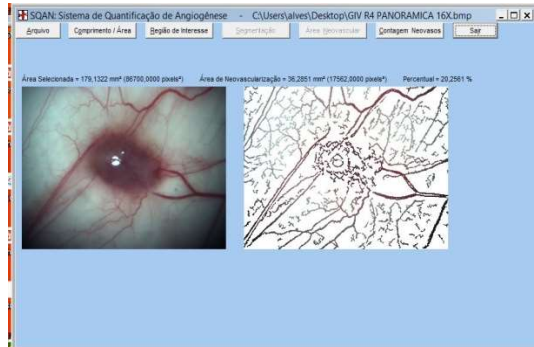
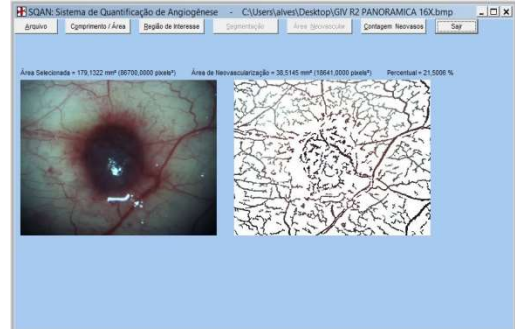
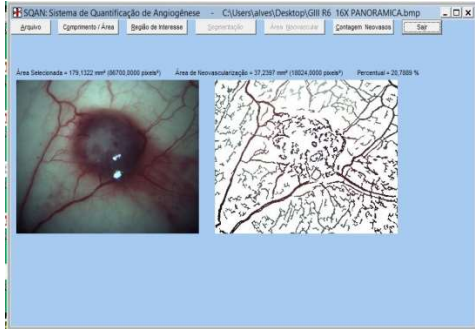
GRUPO II



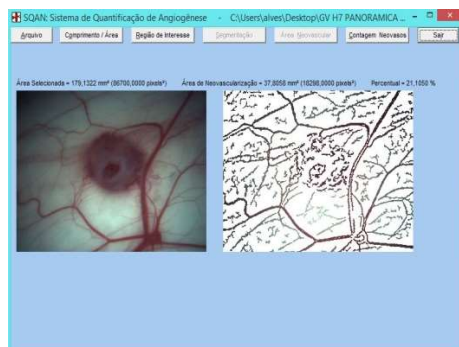
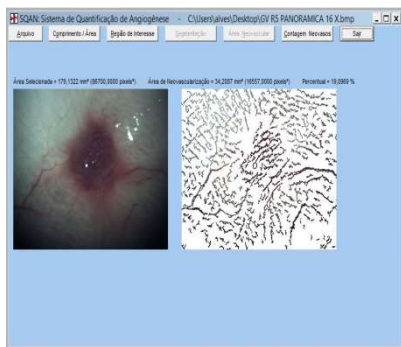
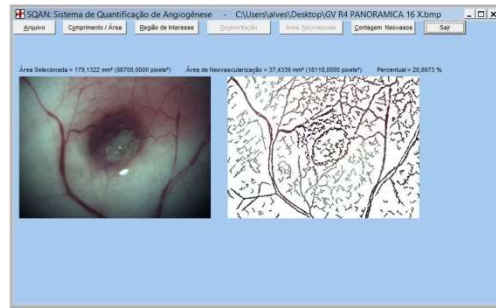
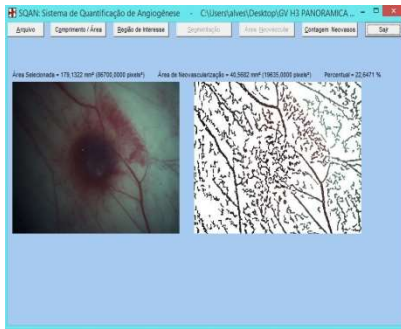
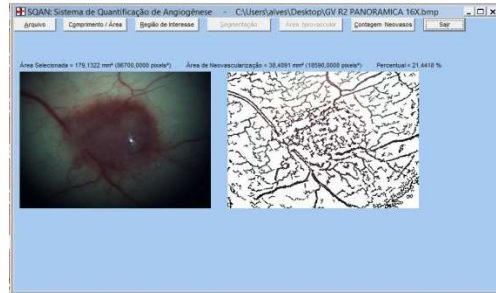
GRUPO III



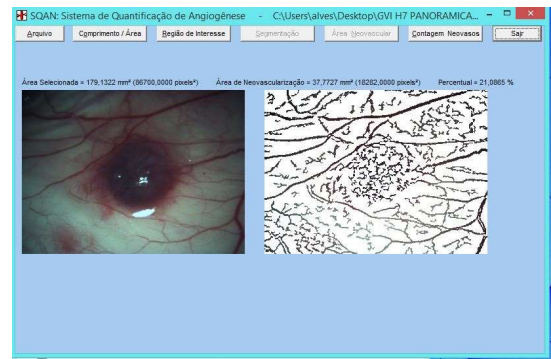
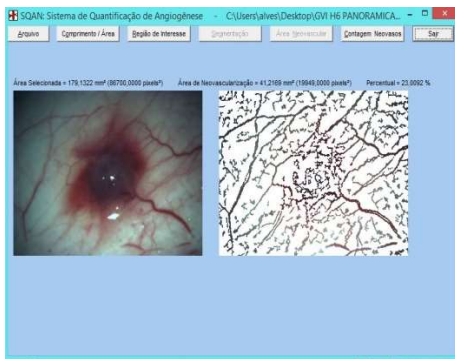
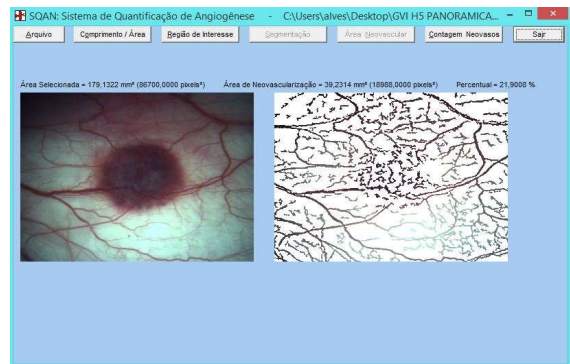
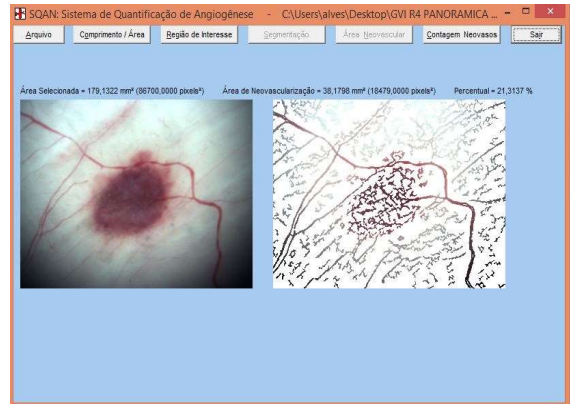
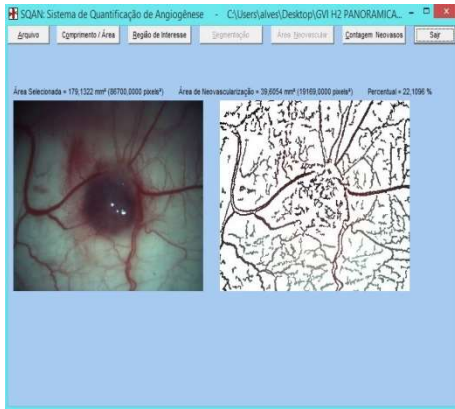
GRUPO IV



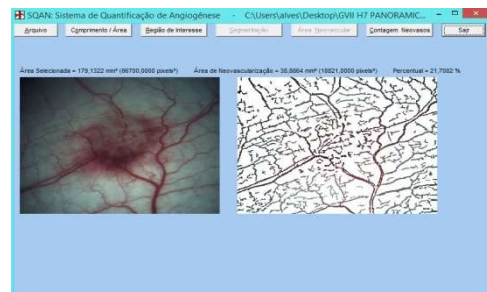
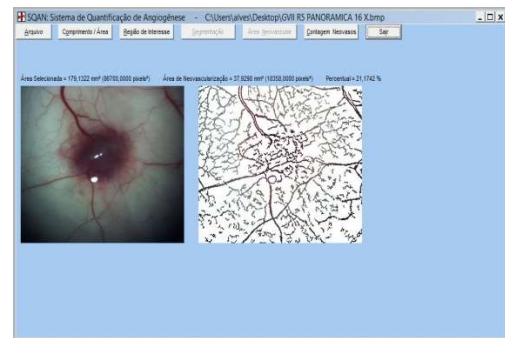
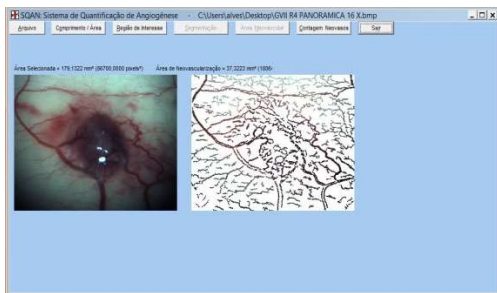
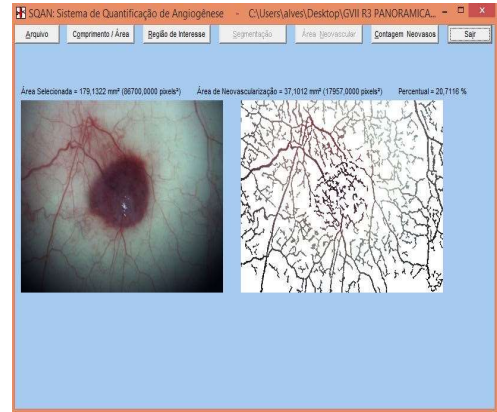
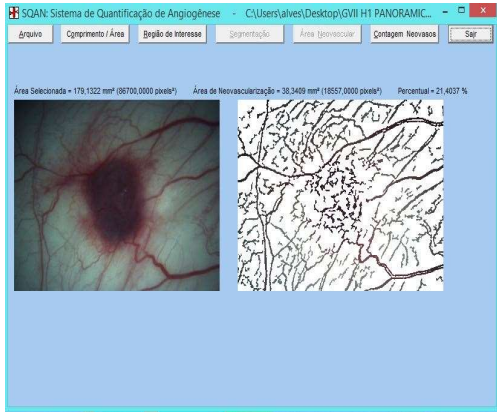
GRUPO V



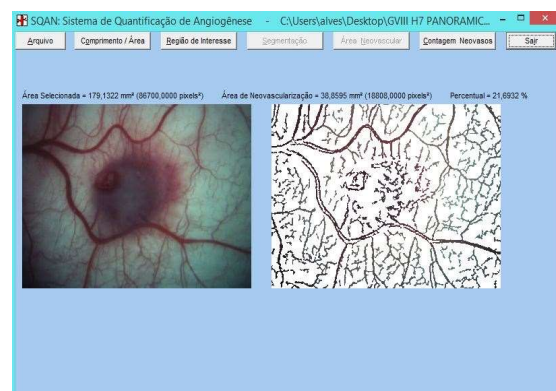
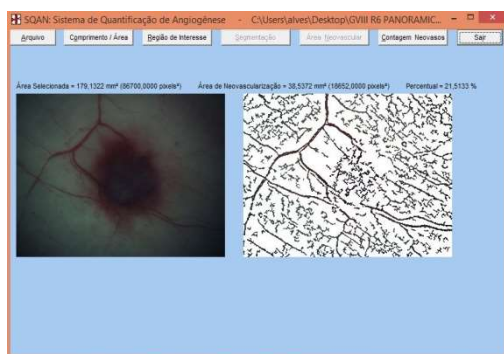
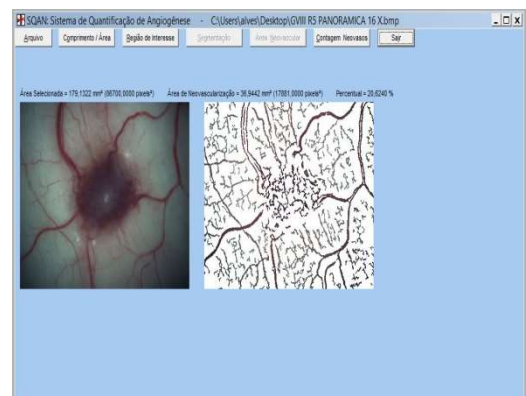
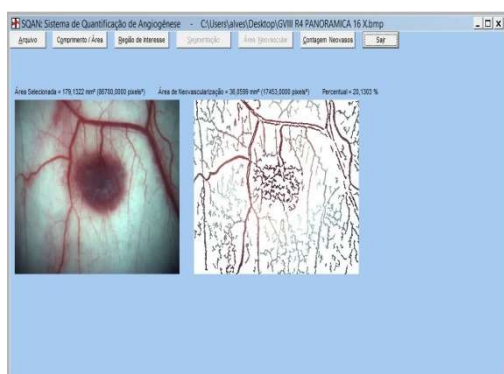
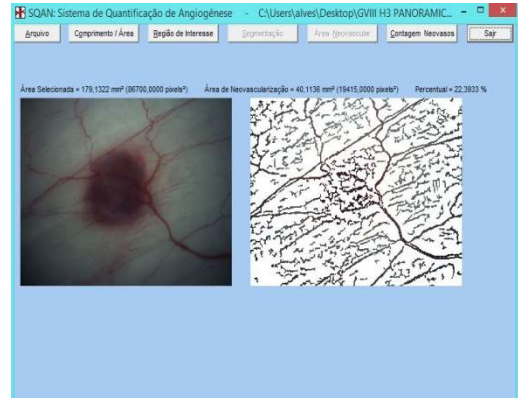
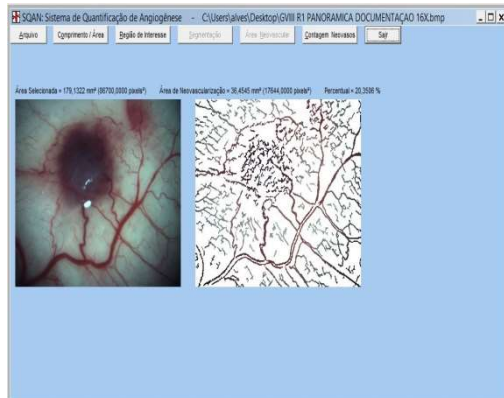
GRUPO VI



GRUPO VII



GRUPO VIII



APÊNDICE B–TABELA DE AVALIAÇÃO QUALITATIVA DAS LÂMINAS NA COLORAÇÃO DE HEMATOXILINA E OSINA POR ESCORES AUSENTE LEVE MODERADO ACENTUADO

AVALIAÇÃO QUALITATIVA DO GRUPO I

Animal	Microabcesso	Mastócito	Macrofágo	Linfócito	Células gigantes	Granuloma de corpo estranho	Fibrose
Hamster 1	0	3	2	2	3	2	2
Hamster 2	0	0	4	2	2	2	2
Hamster 3	4	0	4	2	0	0	4
Hamster 4	4	2	4	2	2	3	4
Hamster 5	0	0	0	0	0	0	0
Hamster 6	0	0	0	0	0	0	0
Total	8	5	14	8	7	7	12

Escores: Ausente (0) Leve (2) Moderado (3) Acentuado (4)

AVALIAÇÃO QUALITATIVA DO GRUPO II

Animal	Microabcesso	Mastócito	Macrofágo	Linfócito	Células gigantes	Granuloma de corpo estranho	Fibrose
Hamster 1	0	0	3	3	3	3	2
Hamster 2	0	0	0	0	0	0	0
Hamster 3	0	0	0	0	0	0	0
Hamster 4	0	0	0	0	0	0	0
Hamster 5	0	0	4	2	3	3	2
Hamster 6	0	0	4	3	3	3	3
Total	0	0	11	8	9	9	7

Escores: Ausente (0) Leve (2) Moderado (3) Acentuado (4)

AVALIAÇÃO QUALITATIVA DO GRUPO III

Animal	Microabcesso	Mastócito	Macrofágo	Linfócito	Células gigantes	Granuloma de corpo estranho	Fibrose
Hamster 1	4	0	2	2	2	2	3
Hamster 2	0	0	0	0	0	0	0
Hamster 3	0	0	4	3	3	3	2
Hamster 4	3	3	3	2	0	0	4
Hamster 5	0	2	3	2	3	3	2
Hamster 6	0	3	4	2	2	2	3
Total	7	8	16	11	10	10	14

Escores: Ausente (0) Leve (2) Moderado (3) Acentuado (4)

AVALIAÇÃO QUALITATIVA DO GRUPO IV

Animal	Microabcesso	Mastócito	Macrofágo	Linfócito	Células gigantes	Granuloma de corpo estranho	Fibrose
Hamster 1	0	2	3	3	3	3	3
Hamster 2	2	2	4	2	0	0	4
Hamster 3	0	3	4	2	3	3	2
Hamster 4	0	2	3	3	3	3	3
Hamster 5	3	2	3	2	3	3	3
Hamster 6	0	2	3	2	3	3	2
Total	5	13	20	14	15	15	17

Escores: Ausente (0) Leve (2) Moderado (3) Acentuado (4)

AVALIAÇÃO QUALITATIVA DO GRUPO V

Animal	Microabcesso	Mastócito	Macrofágo	Linfócito	Células gigantes	Granuloma de corpo estranho	Fibrose
Hamster 1	0	0	0	0	0	0	0
Hamster 2	0	0	0	0	0	0	0
Hamster 3	0	2	3	2	2	2	2
Hamster 4	0	0	0	0	0	0	0
Hamster 5	4	2	2	2	0	0	4
Hamster 6	0	0	0	0	0	0	0
Total	4	4	5	4	2	2	6

Escores: Ausente (0) Leve (2) Moderado (3) Acentuado (4)

AVALIAÇÃO QUALITATIVA DO GRUPO VI

Animal	Microabcesso	Mastócito	Macrofágo	Linfócito	Células gigantes	Granuloma de corpo estranho	Fibrose
Hamster 1	0	0	0	0	0	0	0
Hamster 2	0	0	0	0	0	0	0
Hamster 3	4	0	3	2	3	3	2
Hamster 4	0	0	0	0	0	0	0
Hamster 5	0	2	4	2	3	3	0
Hamster 6	0	2	3	2	3	3	2
Total	4	4	10	6	9	9	4

Escores: Ausente (0) Leve (2) Moderado (3) Acentuado (4)

AVALIAÇÃO QUALITATIVA DO GRUPO VII

Animal	Microabcesso	Mastócito	Macrofágo	Linfócito	Células gigantes	Granuloma de corpo estranho	Fibrose
Hamster 1	0	2	3	2	3	3	2
Hamster 2	0	2	3	2	3	3	2
Hamster 3	3	2	2	2	3	3	2
Hamster 4	0	0	0	0	0	0	0
Hamster 5	0	0	0	0	0	0	0
Hamster 6	0	0	0	0	0	0	0
Total	3	6	8	6	9	9	6

Escores: Ausente (0) Leve (2) Moderado (3) Acentuado (4)

AVALIAÇÃO QUALITATIVA DO GRUPO VIII

Animal	Microabcesso	Mastócito	Macrofágo	Linfócito	Células gigantes	Granuloma de corpo estranho	Fibrose
Hamster 1	4	2	3	2	3	3	2
Hamster 2	0	2	3	2	2	3	2
Hamster 3	0	0	0	0	0	0	0
Hamster 4	0	0	0	0	0	0	0
Hamster 5	0	2	2	2	2	2	2
Hamster 6	0	0	0	0	0	0	0
Total	4	6	8	6	7	8	6

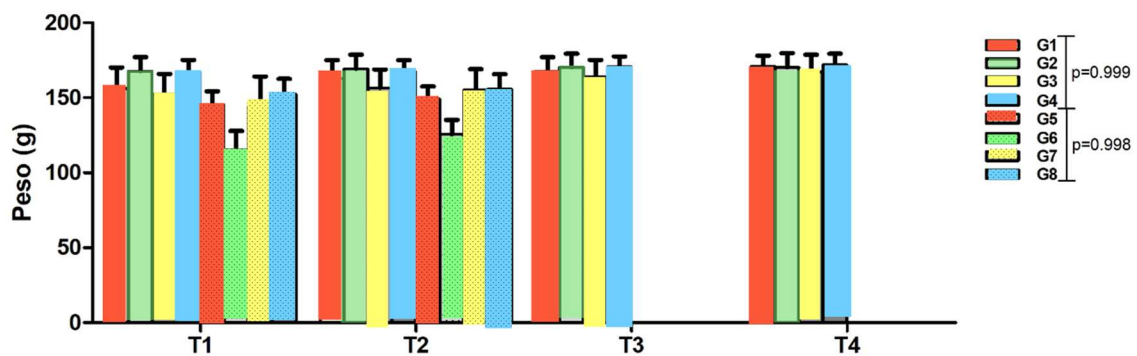
Escores: Ausente (0) Leve (2) Moderado (3) Acentuado (4)

APÊNDICE C–SOMATÓRIO DE ESCORES DOS ACHADOS HISTOLÓGICOS EM LÂMINAS CORADAS EM HE POR GRUPO

Grupo	Microabcesso	Mastócito	Macrofágo	Linfócito	Células gigantes	Granuloma de corpo estranho	Fibrose
I	8	5	14	8	7	7	12
II	0	0	11	8	9	9	7
III	7	8	16	11	10	10	14
IV	5	13	20	14	15	15	17
V	4	4	5	4	2	2	6
VI	4	4	10	6	9	9	4
VII	3	6	8	6	9	9	6
VIII	4	6	8	6	7	8	6
TOTAL	35	46	92	63	68	69	72

APÊNDICE D - TABELA DE MÉDIA DE PESOS DOS ANIMAIS POR GRUPO

GRUPO	1ª SEMANA	2ª SEMANA	3ª SEMANA	4ª SEMANA
I	156,1 g	162,7 g	167,6 g	171 g
II	167,8 g	169,3 g	170,1 g	170,1 g
III	152,2 g	156,5 g	164 g	167,3 g
IV	166,7 g	167,3 g	170,5 g	171,9 g
V	-	-	145,2 g	149 g
VI	-	-	115,4 g	125,5 g
VII	-	-	144 g	155 g
VIII	-	-	152,4 g	155,7 g



Teste 2-way-ANOVA/Bonferroni. Não houve diferença estatística significativa entre os pesos dos animais.

APÊNDICE E-TABELA DE CONSUMO DE SUBSTÂNCIAS POR GRUPO

GRUPO	1ª SEMANA	2ª SEMANA	3ª SEMANA	4ª SEMANA
I	93,6 mg	97,2 mg	99,6mg	102 mg
II	20,1 mg	20,2 mg	20,4mg	20,4 mg
III	45,6mg	46,8 mg	49,2mg	49,8 mg
IV	Água	água	água	água
V	-	-	86,4mg	88,8 mg
VI	-	-	13,80mg	15,06 mg
VII	-	-	43,2 mg	46,2mg
VIII	Água	água	água	água

APÊNDICE F- TABELA DE NEOVASCULARIZAÇÃO POR GRUPO

GRUPO I

Animal	Área Seleccionada	Área de Neovascularização	Porcentagem (%)
H1 panorâmica	Animal excluído	Animal excluído	Animal excluído
H2 panorâmica	86700	19730	22,7566
H3 panorâmica	86700	18169	20,9562
H4 panorâmica	86700	18885	21,782
H5 panorâmica	86700	19147	22,0842
H6 panorâmica	86700	19160	22,0992
H7 panorâmica	86700	18799	21,6828

GRUPO II

Animal	Área Seleccionada	Área de Neovascularização	Porcentagem (%)
H1 panorâmica	86700	18885	21,782
H2 panorâmica	86700	19669	22,6863
H3 panorâmica	86700	20105	23,1892
H4 panorâmica	86700	18911	21,812
H5 panorâmica	86700	19597	22,6032
H6 panorâmica	86700	18661	21,5236

GRUPO III

Animal	Área Seleccionada	Área de Neovascularização	Porcentagem (%)
H1 panorâmica	86700	19293	22,2526
H2 panorâmica	Animal excluído	Animal excluído	Animal excluído
H3 panorâmica	86700	18963	21,872
H4 panorâmica	86700	18709	21,579
H5 panorâmica	86700	19242	22,1938
H6 panorâmica	86700	18024	20,7889
H7 panorâmica	86700	18946	21,8524

GRUPO IV

Animal	Área Seleccionada	Área de Neovascularização	Porcentagem (%)
H1 panorâmica	86700	18024	20,7889
H2 panorâmica	86700	18641	21,5006
H3 panorâmica	86700	19045	21,9666
H4 panorâmica	86700	17562	20,2561
H5 panorâmica	86700	19037	21,9573
H6 panorâmica	86700	18342	21,1557

GRUPO V

Animal	Área Seleccionada	Área de Neovascularização	Porcentagem (%)
H1 panorâmica	86700	19252	22,2053
H2 panorâmica	86700	18590	21,4418
H3 panorâmica	86700	19635	22,6471
H4 panorâmica	86700	18118	20,8973
H5 panorâmica	86700	16557	19,0969
H6 panorâmica	Animal excluído	Animal excluído	Animal excluído
H7 panorâmica	86700	18298	21,105

GRUPO VI

Animal	Área Seleccionada	Área de Neovascularização	Porcentagem (%)
H1 panorâmica	Animal excluído	Animal excluído	Animal excluído
H2 panorâmica	86700	19169	22,1096
H3 panorâmica	86700	18479	21,3137
H4 panorâmica	86700	18344	21,158
H5 panorâmica	86700	18988	21,9008
H6 panorâmica	86700	19949	23,0092
H7 panorâmica	86700	18282	21,0865

GRUPO VII

Animal	Área Seleccionada	Área de Neovascularização	Porcentagem (%)
H1 panorâmica	86700	18557	21,4037
H2 panorâmica	Animal excluído	Animal excluído	Animal excluído
H3 panorâmica	86700	17957	20,7116
H4 panorâmica	86700	18064	20,831
H5 panorâmica	86700	18358	21,1742
H6 panorâmica	86700	19007	21,9227
H7 panorâmica	86700	18821	21,7082

GRUPO VIII

Animal	Área Seleccionada	Área de Neovascularização	Porcentagem (%)
H1 panorâmica	86700	17644	20,3506
H2 panorâmica	Animal excluído	Animal excluído	Animal excluído
H3 panorâmica	86700	19415	22,3933
H4 panorâmica	86700	17453	20,1303
H5 panorâmica	86700	17881	20,624
H6 panorâmica	86700	18652	21,5133
H7 panorâmica	86700	18808	21,6932

APÊNDICE G- TABELA DE AVALIAÇÃO DA ANGIOGÊNESE NOS GRUPOS I, II, III E IV, POR MEIO DA DETERMINAÇÃO DA ÁREA VASCULAR EM IMAGENS ESTEREOSCÓPICAS PANORÂMICAS DA CIRCUNVIZINHANÇA DA ESPONJA, EXPRESSA EM PIXELS E EM TERMOS PERCENTUAIS.

Área vascular	Grupo I Média ± DP (n)	Grupo II Média ± DP (n)	Grupo III Média ± DP (n)	Grupo IV Média ± DP (n)	Significância (ANOVA)
Pixels	18981,67 ± 514,25 (6)	19304,67 ± 566,42 (6)	18862,83 ± 463,26 (6)	18441,83 ± 585,89 (6)	$p = 0,0752$
Percentual	21,89 ± 0,59 (6)	22,27 ± 0,65 (6)	21,76 ± 0,53 (6)	21,27 ± 0,68 (6)	$p = 0,2122$

*DP: desvio padrão

APÊNDICE H - TABELA DE AVALIAÇÃO DA ANGIOGÊNESE NOS GRUPOS V, VI, VII E VIII, POR MEIO DA DETERMINAÇÃO DA ÁREA VASCULAR EM IMAGENS ESTEREOSCÓPICAS PANORÂMICAS DA CIRCUNVIZINHANÇA DA ESPONJA, EXPRESSA EM PIXELS E EM TERMOS PERCENTUAIS

Área vascular	Grupo V Média ± DP (n)	Grupo VI Média ± DP (n)	Grupo VII Média ± DP (n)	Grupo VIII Média ± DP (n)	Significância (ANOVA)
Pixels	18408,33 ± 1074,56 (6)	18868,50 ± 639,20 (6)	18460,67 ± 414,53 (6)	18308,83 ± 767,86 (6)	$p = 0,6069$
Percentual	21,23 ± 1,24 (6)	21,76 ± 0,74 (6)	21,29 ± 0,48 (6)	21,12 ± 0,89 (6)	$p = 0,6069$

*DP: desvio padrão.

APENDICE I - AVALIAÇÃO DA INFLAMAÇÃO DOS GRUPOS I E III (PRÓPOLIS VERMELHA E GOMA ARÁBICA RESPECTIVAMENTE), POR MEIO DA DETERMINAÇÃO DE ESCORES, EXPRESSA EM TERMOS ABSOLUTOS E PERCENTUAIS

	Grupo		p-Valor
	I	III	
Microabcesso			
Ausente	4 66,7%	4 66,7%	0,513
Leve	0 ,0%	0 ,0%	
Moderado	0 ,0%	1 16,7%	
Acentuado	2 33,3%	1 16,7%	
Mastócito			
Ausente	4 66,7%	3 50,0%	0,788
Leve	1 16,7%	1 16,7%	
Moderado	1 16,7%	2 33,3%	
Macrófago			
Ausente	2 33,3%	1 16,7%	0,469
Leve	1 16,7%	1 16,7%	
Moderado	0 ,0%	2 33,3%	
Acentuado	3 50,0%	2 33,3%	
Linfócito			
Ausente	2 33,3%	1 16,7%	0,513
Leve	4 66,7%	4 66,7%	
Moderado	0 ,0%	1 16,7%	
Células gigantes			
Ausente	3 50,0%	2 33,3%	0,766
Leve	2 33,3%	2 33,3%	
Moderado	1 16,7%	2 33,3%	
Granuloma de corpo estranho			
Ausente	3 50,0%	2 33,3%	0,766
Leve	2 33,3%	2 33,3%	
Moderado	1 16,7%	2 33,3%	
Fibrose			
Ausente	2 33,3%	1 16,7%	0,446
Leve	2 33,3%	2 33,3%	
Moderado	0 ,0%	2 33,3%	
Acentuado	2 33,3%	1 16,7%	

APENDICE J- AVALIAÇÃO DA INFLAMAÇÃO DOS GRUPOS V E VII (PRÓPOLIS VERMELHA E GOMA ARÁBICA RESPECTIVAMENTE), POR MEIO DA DETERMINAÇÃO DE ESCORES, EXPRESSA EM TERMOS ABSOLUTOS E PERCENTUAIS

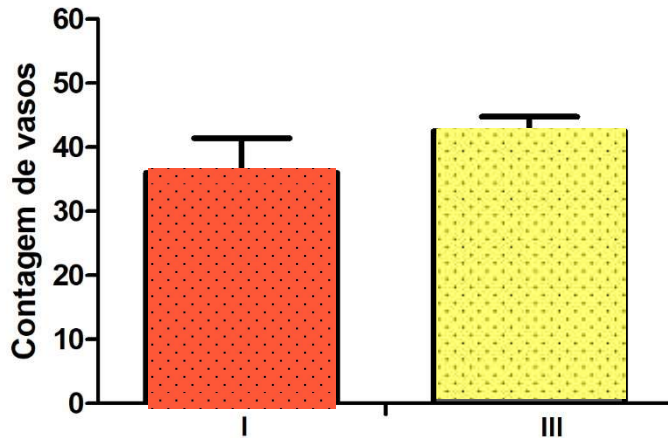
	Grupo		p-Valor
	V	VII	
Microabcesso			
Ausente	5 83,3%	5 83,3%	0,368
Moderado	0 ,0%	1 16,7%	
Acentuado	1 16,7%	0 ,0%	
Mastócito			
Ausente	4 66,7%	3 50,0%	1,000
Leve	2 33,3%	3 50,0%	
Macrófago			
Ausente	4 66,7%	3 50,0%	0,788
Leve	1 16,7%	1 16,7%	
Moderado	1 16,7%	2 33,3%	
Acentuado	0 ,0%	0 ,0%	
Linfócito			
Ausente	4 66,7%	3 50,0%	1,000
Leve	2 33,3%	3 50,0%	
Células gigantes			
Ausente	5 83,3%	3 50,0%	0,105
Leve	1	0	

	16,7%	,0%	
Grupo			
	V	VII	P-Valor
Moderado	0	3	
	,0%	50,0%	
Granuloma de corpo estranho			
Ausente	5	3	0,105
	83,3%	50,0%	
Leve	1	0	
	16,7%	,0%	
Moderado	0	3	
	,0%	50,0%	
Fibrose			
Ausente	4	3	0,343
	66,7%	50,0%	
Leve	1	3	
	16,7%	50,0%	
Acentuado	1	0	
	16,7%	,0%	

APENDICE K - AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DA INFLAMAÇÃO COMPARANDO OS GRUPOS I E III.

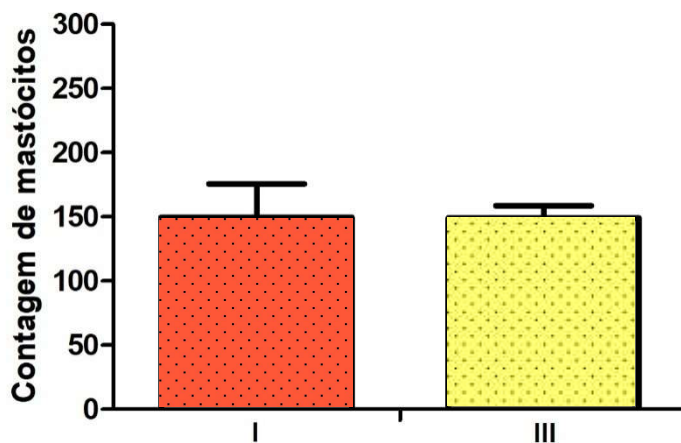
Na comparação do número de vasos sanguíneos, entre os grupos I (própolis vermelha) e III (goma arábica), não houve diferença estatística significativa, apresentando $p= 0,305$ (figura A).

Figura A– Contagem dos vasos sanguíneos dos grupos I e III



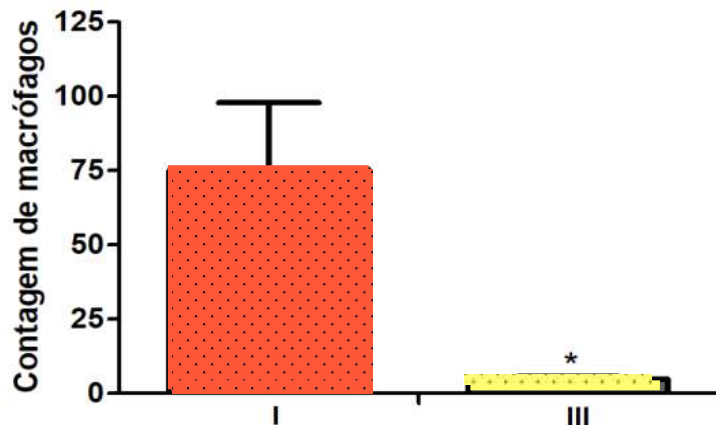
Na comparação do número de mastócitos, entre os grupos I (própolis vermelha) e III (goma arábica), não houve diferença estatística significativa, apresentando $p=0,986$ (figura B).

Figura B– Contagem dos mastócitos dos grupos I e III



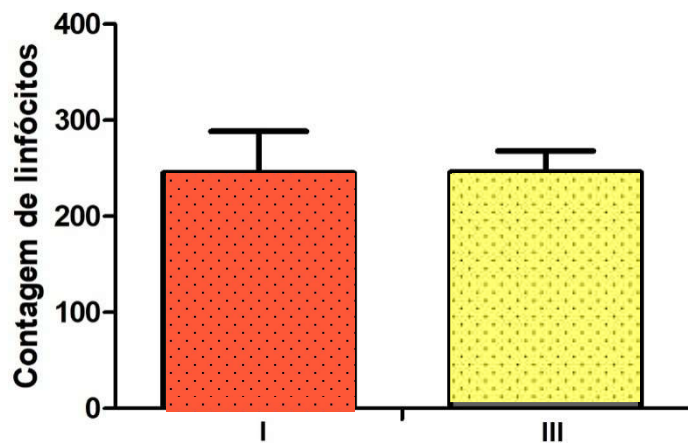
Na comparação do número de macrófagos, entre os grupos I (própolis vermelha) e III (goma arábica), o grupo tratado com goma arábica foi significante menor, apresentando $p= 0,026$ (Figura C).

Figura C– Contagem dos macrófagos dos grupos I e III



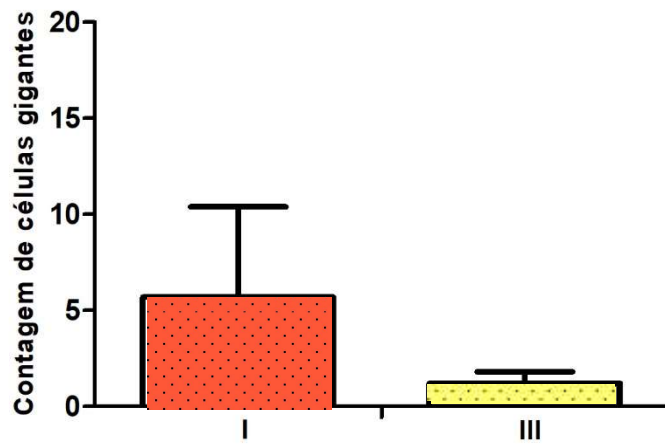
Na comparação do número de linfócitos, entre os grupos I (própolis vermelha) e III (goma arábica), não houve diferença estatística significativa, apresentando $p= 0,989$ (figura D).

Figura D– Contagem dos linfócitos dos grupos I e III



Na comparação do número de células gigantes, entre os grupos I (própolis vermelha) e III (goma arábica) não houve diferença estatística significativa, apresentando $p= 0,363$ (figura E).

Figura E– Contagem de células gigantes dos grupos I e III



**APÊNDICE L-TABELA DE AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DA INFLAMAÇÃO DOS
GRUPOS I E III, EXPRESSA EM MÉDIA E ERRO-PADRÃO DA MÉDIA.**

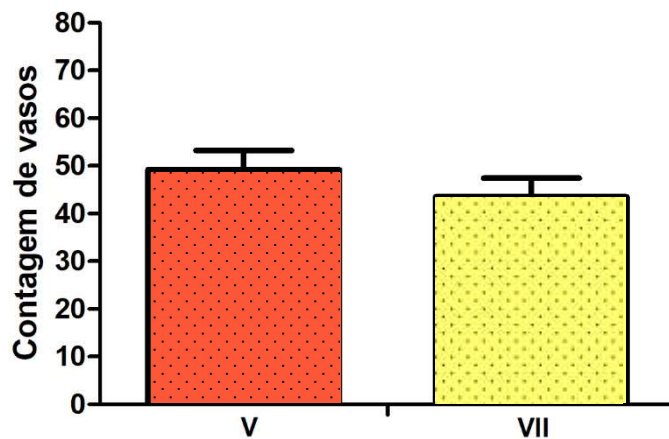
	Grupo		<i>p</i> -Valor
	I	III	
Vasos	36,0±5,4	42,5±2,3	0,305
Mastócitos	149,7±25,9	149,2±9,5	0,986
Macrófagos	75,5±22,5	4,8±0,8	0,026
Linfócitos	245,0±43,6	245,7±22,5	0,989
Células gigantes	5,7±4,7	1,2±0,6	0,363

*para significância estatística considera-se $p < 0,05$, teste t de Student.

APÊNDICE M - AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DA INFLAMAÇÃO COMPARANDO OS GRUPOS V E VII.

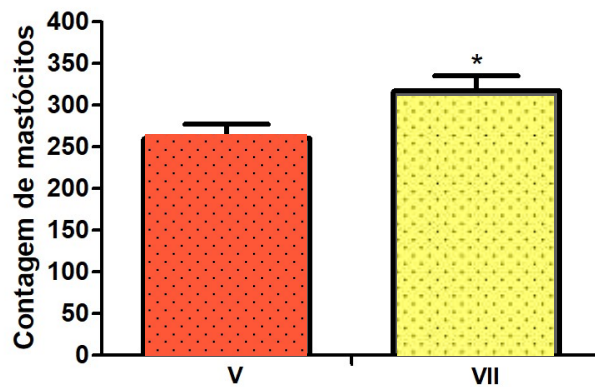
Na comparação do número de vasos sanguíneos entre os grupos V (própolis vermelha) e VII (goma arábica) não houve diferença estatística significativa, apresentando $p= 0,330$ (figura F).

Figura F– Contagem dos vasos sanguíneos dos grupos V e VII



Na comparação do número de mastócitos entre os grupos V (própolis vermelha) e VII (goma arábica), o grupo da própolis vermelha foi significante menor, apresentando $p= 0,041$ (figura G)

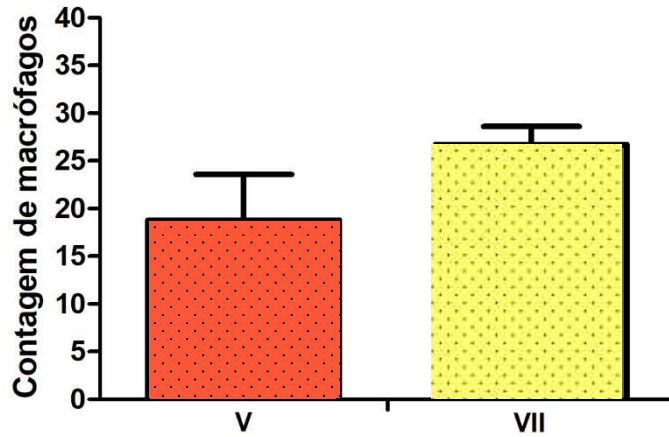
Figura G– Contagem dos mastócitos dos grupos V e VII



Na comparação do número de macrófagos, entre os grupos V (própolis vermelha) e VII (goma

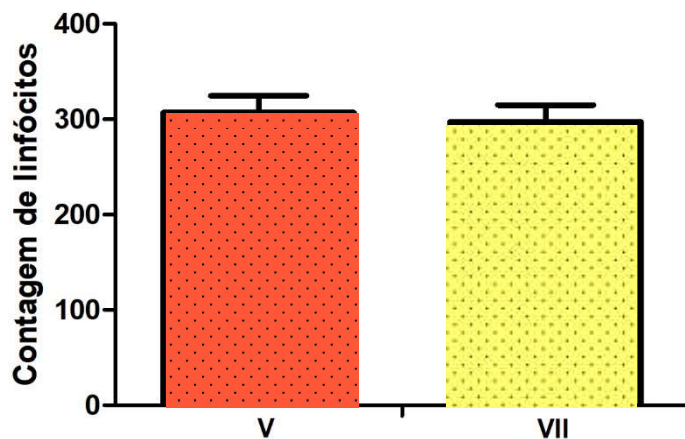
arábica) não houve diferença estatística significativa, apresentando $p = 0,161$ (figura H).

Figura H– Contagem dos macrófagos dos grupos V e VII



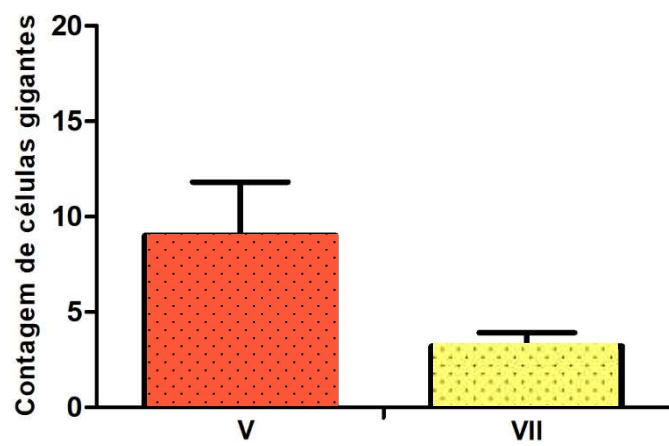
Na comparação do número de linfócitos entre os grupos V (própolis vermelha) e VII (goma arábica) não houve diferença estatística significativa, apresentando $p = 0,702$ (figura I).

Figura I– Contagem dos linfócitos dos grupos V e VII



Na comparação do número de células gigantes, entre os grupos V (própolis vermelha) e VII (goma arábica) não houve diferença estatística significativa, apresentando $p = 0,093$ (figura J).

Figura J– Contagem de células gigantes dos grupos V e VII



**APENDICE N- TABELA DE AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DA INFLAMAÇÃO
 DOS GRUPOS V E VII, EXPRESSA EM MÉDIA E ERRO-PADRÃO DA MÉDIA.**

	Grupos		<i>p</i> -Valor
	V	VII	
Vasos	49,2±4,0	43,5±3,9	0,330
Mastócitos	259,7±17,0	317,3±17,6	0,041
Macrófagos	18,8±4,8	26,7±1,9	0,161
Linfócitos	306,8±17,6	297,0±17,7	0,702
Células gigantes	9,0±2,8	3,2±0,7	0,093

* teste t de Student.

ANEXO A- APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA PELO CEUA – UFC



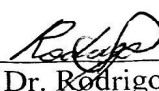
Universidade Federal do Ceará
 Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA
 Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
 Cep: 60430-970 Fortaleza-CE

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA PROPOLIS VERMELHA NA ANGIOGENESE E VIA DE SINALIZAÇÃO DO VEGF EM BOLSA JUGAL DE HAMSTER SUBMETIDOS A IMPLANTE DE ESPONJA ABSORVÍVEL", protocolo nº 05/2016, sob responsabilidade da Profa. Dra. Conceição Aparecida Dorneles, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de nº8 de outubro de 2008, do Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFC) da Universidade Federal do Ceará, em reunião em 26 de março de 2016.

Vigência do projeto	Janeiro/2016 a dezembro/2017
Espécie/Linhagem	Hamster
Nº de Animais	48
Peso/Idade	40g
Sexo	Fêmea
Origem	Biotério Central da UFC

Fortaleza, 26 de março de 2016


 Prof. Dr. Rodrigo Siqueira
 Coordenador do CEUA - UFC
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
 RODRIGO JOSÉ BEZERRA DE SIQUEIRA
 COORDENADOR DA COMISSÃO DE ÉTICA E DO USO COM
 ANIMAIS - CEUA/UFC - Matrícula SIAPE: 1520734

ANEXO B -COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL DA RAÇÃO NUVILAB CR-1 IRRADIADA

COMPOSIÇÃO BÁSICA DO PRODUTO: MILHO INTEGRAL MOÍDO, FARELO DE SOJA, FARELO DE TRIGO, CARBONATO DE CÁLCIO, FOSFATO BICÁLCICO, CLORETO DE SÓDIO, ÓLEO VEGETAL, VITAMINA A, VITAMINA D3, VITAMINA E, VITAMINA K3, VITAMINA B1, VITAMINA B2, VITAMINA B6, VITAMINA B12, NIACINA, PANTOTENATO D CÁLCIO, ÁCIDO FÓLICO, BIOTINA, CLORETO DE COLINA, SULFATO DE FERRO, MONÓXIDO DE MANGANÊS, ÓXIDO DE ZINCO, SULFATO DE COBRE, IODATO DE CÁLCIO, SELENITO DE SÓDIO, SULFATO DE COBALTO, LISINA, METIONINA, BHT.

NÍVEIS DE GARANTIA POR QUILOGRAMA DO PRODUTO: UMIDADE (MÁX): 125g/kg PROTEÍNA BRUTA (MIN): 220g/kg EXTRATO ETÉREO (MIN): 50g/kg MATERIAL MINERAL (MÁX): 90g/kg FIBRA BRUTA (MÁX): 70g/kg CÁLCIO (MÍN-MÁX): 10-14 g/kg FÓSFORO; 6.000 mg/kg

VITAMINAS: A (MIN) 13.000 UI/Kg; VITAMINA D3 (MIN) 2.000 UI/Kg, VITAMINA E (MIN) 34 UI/Kg, VITAMINA K3 (MIN) 3mg/Kg, VITAMINA B1 (MIN) 5 mg/Kg, VITAMINA B2 (MIN) 6mg/Kg, VITAMINA B6 (MIN) 7 mg/Kg, VITAMINA B12 (MIN) 22 mcg/Kg, NIACINA (MIN) 60 mg/Kg, PANTOTENO DE CÁLCIO (MIN) 21 mg/Kg, ÁCIDO FÓLICO (MIN) 1mg/Kg, BIOTINA (MIN) 0,05mg/Kg, COLINA 1.900 mg/Kg. MINERAIS: SÓDIO (MIN) 2700 mg/Kg; FERRO (MIN) 50mg/Kg; MANGANÊS (MIN) 60mg/Kg; ZINCO (MIN) 60mg/Kg; COBRE (MIN) 10mg/Kg; IODO (MIN) 2MG/KG; SELÊNIO (MIN) 0,05mg/Kg; COBALTO (MIN) 1,5 mg/Kg, FLÚOR (MÁX) 60mg/Kg. AMINOÁCIDOS: LISINA (MIN) 12g/Kg, METIONINA (MIN) 4.000Mg/Kg, ADITIVOS BHT 100,00mg/Kg.

Indicação :ração irradiada para camundongos e ratos de laboratório

Uso: administração a vontade em comedouros suspensos