

Universidade Federal de Minas Gerais
Programa de Pós-Graduação em Patologia
Faculdade de Medicina

**EFEITO DA PRÓPOLIS VERDE NOS COMPONENTES
ANGIOGÊNICO, INFLAMATÓRIO E FIBROGÊNICO EM
MODELO MURINO DE ADERÊNCIA INTRAPERITONEAL**

LUIZA DIAS DA CUNHA LIMA

Belo Horizonte

2012

LUIZA DIAS DA CUNHA LIMA

**EFEITO DA PRÓPOLIS VERDE NOS COMPONENTES ANGIOGÊNICO,
INFLAMATÓRIO E FIBROGÊNICO EM MODELO MURINO DE ADERÊNCIA
INTRAPERITONEAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Patologia da Universidade Federal de Minas Gerais,
como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre

Orientadora: Profa Dra Mônica Alves Neves Diniz Ferreira

Co-orientadora: Profa Dra Sílvia Passos Andrade

Belo Horizonte

2012

"Mire veja: o mais importante e bonito, do mundo, é isto: que as pessoas não estão sempre iguais, elas não foram terminadas - mas que elas vão sempre mudando."

Guimarães Rosa

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por me permitir chegar até onde cheguei, me dando força e sabedoria para seguir sempre em frente.

Agradecimento mais que especial à Mônica, que me acolheu nesse mestrado sempre com paciência mesmo nos dias mais aflitos, com suas palavras de conforto e incentivo. Foi um imenso prazer ser sua aluna, me proporcionando um aprendizado incrível nessa caminhada.

À Silvia, mais uma vez, um muito obrigada por estar ao meu lado em mais uma etapa cumprida. Pelas oportunidades, pelos braços sempre abertos e pela confiança.

Aos meus pais, a quem eu jamais poderia deixar de falar um enorme MUITO OBRIGADA, por tudo! Pelo colo nas horas de aperto, pela confiança de que tudo vai dar certo, por caminharem sempre ao meu lado. Vocês tiveram um papel essencial nessa dissertação e sabem disso!

Ao meu irmão, meu companheiro de dia-a-dia, de casa, que teve que me aturar inúmeras vezes de mau humor nos dias ruins e que, ainda assim sempre me estendia a mão. Obrigada Irmão!

Aos meus avós, tios, primos pelo suporte e pelo real significado de FAMÍLIA! Em especial à Bia que se identificava e vivia junto comigo as aflições desta etapa.

Obrigada à todos os amigos do Laboratório de Angiogênese, Paula, Brígida, Celso Tarso Carpo, Suzane, Pollyana, Cibele, Allan, Fabrício, Jousie, Leandro Barbosa, Leandro Ceotto, Camila e Professora Lucíola, que me permitiram momentos de alegria quando tudo parecia desesperador. E claro, obrigada também à Ciça que sei que estará torcendo por mim à quilômetros de distância. Saudades sem fim!

Não podia deixar de citar os colegas do Departamento, de disciplinas, que compartilharam comigo a correria do mestrado e as dificuldades encontradas,

mas principalmente obrigada pelos aprendizados compartilhados e adquiridos.

Agradeço também às amigas Carina e Silvana, que sei que estavam comigo dividindo cada momento deste mestrado, torcendo e que faziam meus almoços corridos na Copa mais divertidos. Cá muito obrigada pela amizade e companhia não só nos momentos de diversão como também nos fins de semana de experimento, né?!!

Aos demais amigos, Ivan, Samir, Bárbara, Fefê, Giulia, Bruninha, aos feiões, pela amizade, pelas diversões, e até pelas tentações quando eu tentava manter o foco.... Mas que nunca me deixavam desistir nem duvidar do meu potencial quando eu mesma parecia desacreditar.

Por fim e de novo, muitíssimo obrigada àquela pessoa que, há 5 anos e meio me adotou e caminhou junto comigo; que me ensinou o be-a-bá da pesquisa e dessa luta de acertos e erros contidos no universo acadêmico. Sandra, OBRIGADA!!

Obrigada ainda a todos, que mesmo não citados, não foram menos importantes e contribuíram de uma forma ou de outra, para que eu pudesse chegar ao final e vencesse mais essa etapa.

RESUMO

Aderência intraperitoneal é a principal causa de complicações pós-operatórias, como dor crônica, isquemia, obstrução intestinal e infertilidade. A própolis, um composto produzido por abelhas, tem mostrado possuir múltiplas ações no reparo tecidual. Utilizando um modelo de aderência intraperitoneal induzido por implantes de esponja em camundongos *Swiss*, nós observamos que o tratamento sistêmico com a própolis verde (500mg/kg/dia) diminuiu a taxa de difusão intraperitoneal da fluoresceína sódica, sinalizando uma redução da permeabilidade vascular. Além disso, a própolis diminuiu a angiogênese, determinada pela regulação no conteúdo de hemoglobina, e a fibrose, por diminuir os níveis de TGF- β 1 e de deposição de colágeno. Por outro lado, o tratamento aumentou a atividade de enzimas inflamatórias (mieloperoxidase e N-acetil- β -D-glicosaminidase) e os níveis de TNF- α . De maneira importante, o tratamento com própolis foi capaz de ativar tanto o perfil clássico de macrófagos quanto o alternativo, embora a ativação esteja mais expressiva para M1. A expressão de iNOS estava aumentada em aproximadamente 23 vezes e em 7 vezes para IFN- γ . Um aumento na expressão gênica de FIZZ1 e YM1 no tecido de aderência também foi detectado após o tratamento com própolis. Estas observações mostraram pela primeira vez o efeito atenuante da própolis em aderência em camundongos e revelaram mecanismos de ação importantes do composto (regulação dos componentes angiogênicos e ativação das vias de macrófagos murinos).

Paravras-chave: extrato aquoso da própolis, citocinas, ativação de macrófagos, fibrose.

ABSTRACT

Intraperitoneal adhesion formation is the major cause of postoperative complications, such as chronic pain, ischemia, bowel obstruction, and infertility. Propolis, a wax bee product has been shown to exhibit multiple actions on tissue repair. Using a model of implant-induced intraperitoneal adhesion in Swiss mice, we showed that systemic treatment with propolis (500/mg/kg/day) was able to decrease intraperitoneal diffusion rate of sodium fluorescein an effect decreasing vascular permeability. In addition, propolis was shown to down regulate angiogenesis (as determined by hemoglobin content) and fibrosis by decreasing the levels of TGF- β 1 and collagen deposition in the adhesion induced by the synthetic implants. Conversely, the treatment up-regulated inflammatory enzyme activities (myeloperoxidase and n-acetyl- β -D-glucosaminidase) and TNF- α levels. Most importantly, propolis treatment was able to activate both the classical and alternative macrophage pathways, although it was more expressive in M1 macrophages. Approximately 23 fold increase in iNOS and 7 fold increase in IFN- γ was observed. Increase in gene expression of FIZZ1 and YM1 in the adhesion tissue was also detected after propolis treatment. These observations show for the first time the effects of propolis attenuating adhesion in mice and disclose important mechanisms of actions of the compound (down regulation of angiogenic components and activation of murine macrophage pathways).

Key words: Water extract propolis, cytokines, macrophage activation, fibrosis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Confeção dos implantes de esponja e implante na cavidade abdominal.....	35
Figura 2 - Tratamento dos animais por gavagem e dosagem da fluoresceína.	38
Figura 3 - Aderência após 5 dias e aspecto do implante de esponja na cavidade abdominal (A). Aspecto da esponja antes do implante (B) e depois de ser retirado da cavidade abdominal (C).....	46
Figura 4 - Tempo do pico máximo de difusão da fluoresceína.	47
Figura 5 - Peso das esponjas após 5 dias de implante.	48
Figura 6- Análise dos parâmetros angiogênicos da aderência intra-peritoneal. (A) Conteúdo de hemoglobina intra-implantes e (B) citocina VEGF medida nos implantes de esponja..	49
Figura 7 - Análise da deposição de colágeno e TGF- β 1 dos implantes na cavidade abdominal. (A) Concentração de TGF- β 1 e (B) avaliação do colágeno.	50
Figura 8 - Análise dos componentes inflamatórios. (A) Avaliação da atividade da enzima MPO e (B) avaliação da atividade de NAG.....	51
Figura 9 - Análise da produção da citocina inflamatória TNF- α	52
Figura 10 – Expressão gênica para análise do perfil de macrófagos. Expressão dos genes para macrófagos classicamente ativados (iNOS e IFN- γ) (A) e para macrófagos alternativamente ativados (FIZZ1 e YM1) (B).....	53
Figura 11 - Corte histológico do implante intraperitoneal de esponja corado pelo tricrômico de Gomori.	55

LISTA DE ABREVIATURAS

bFGF	Fator de crescimento básico de fibroblastos
CEBIO	Centro de Bioterismo da UFMG
CETEA	Comitê de Ética de Experimentação Animal
DMSO	Dimetilsulfóxido
EAP	Extrato aquoso da própolis
Hb	Hemoglobina
HE	Hematoxilina-eosina
HIF	Fator induzido por hipóxia
ICAM-1	Molécula de adesão intracelular
IFN- γ	Interferon gama
IL-1	Interleucina 1
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-13	Interleucina 13
LPS	Lipopolissacarídeo
MEC	Matriz extracelular
MPO	Mieloperoxidase
NAG	N-acetil- β -D-glicosaminidase
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
OD	Densidade óptica

PA	Ativador de plasminogênio
PAI	Inibidor do ativador de plasminogênio
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PMN	Polimorfonuclear
ROS	Espécie reativa de oxigênio
TGF- β	Fator de crescimento transformante beta
TIMP	Inibidor tecidual de metaloproteases
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
tPA	Ativador de plasminogênio tecidual
VCAM-1	Molécula de adesão vascular
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	13
1.1	A Caverna Abdominal.....	13
1.1.1	<i>Células mesoteliais</i>	14
1.2	Aderências intraperitoneais.....	15
1.2.1	<i>Inflamação, angiogênese e fibrose</i>	17
1.2.2	<i>Fisiopatologia da formação de aderência peritoneal</i>	22
1.3	Modelo de aderência induzida por implantes de esponja.....	26
1.4	Própolis.....	27
2	OBJETIVOS.....	33
2.1	Objetivo geral.....	33
2.2	Objetivos específicos.....	33
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
3.1	Animais.....	34
3.2	Implante das esponjas.....	34
3.3	Obtenção da própolis e tratamento dos animais.....	36
3.4	Avaliação do efeito da própolis na inflamação da caverna peritoneal pelo método de difusão da fluoresceína.....	37
3.5	Dosagem de Hemoglobina (Hb).....	39
3.6	Quantificação do colágeno.....	39
3.7	Avaliação da atividade da Mieloperoxidase (MPO).....	40

3.8	Avaliação da atividade de N-acetil- β -D-glicosaminidase (NAG).....	41
3.9	Quantificação das citocinas (VEGF, TNF- α , TGF- β 1)	42
3.10	Análise da expressão de genes associados com a ativação de macrófagos.....	43
3.11	Avaliação histológica.....	44
3.12	Análise estatística	44
4	RESULTADOS	45
4.1	Reatividade Vascular	47
4.2	Análise do peso e do índice vascular	48
4.3	Avaliação dos parâmetros fibrogênicos.....	49
4.4	Avaliação dos componentes inflamatórios.....	51
4.5	Perfil da expressão gênica dos macrófagos	52
4.6	Análise histológica	544
5	DISCUSSÃO	56
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	666

1. INTRODUÇÃO

1.1 A Cavidade Abdominal

O peritônio representa uma membrana serosa de origem mesodérmica, que consiste de uma monocamada contínua de células mesoteliais ancoradas à membrana basal. O tecido conjuntivo subjacente consiste principalmente de fibras colágenas frouxas, incluindo fibroblastos, vasos sanguíneos e linfáticos, bem como fibras nervosas (Bittinger, 1997). Medindo cerca de 2 m² em adultos, o peritônio constitui a maior superfície serosa do corpo humano (Thors & Drukker, 1997). Classicamente, são atribuídas três funções principais ao mesotélio: 1) prover uma barreira anatômica de proteção; 2) interface de não fricção para o movimento dos órgãos e tecidos, e 3) estar envolvido na formação e movimentação do fluido abdominal (Runyon, 1995; Carter *et al*, 1997).

O peritônio pode ser considerado uma membrana semipermeável bidirecionalmente com alta capacidade absorviva (Robinson, 1962). Dentro da cavidade peritoneal encontra-se, em condições normais, menos que 100 mL de um fluido que facilita a função normal do trato gastrointestinal e da bexiga, além de ter função importante no trato genital feminino sobre a mobilidade das trompas de falópio e na captação do oócito. Em indivíduos normais, este fluido é caracterizado por um baixo conteúdo celular e proteico e sua quantidade pode aumentar e a composição ser alterada consideravelmente em diferentes condições patológicas (Beelen, 1991), além de apresentar propriedades bactericidas e bacteriostáticas.

Na cavidade peritoneal, a ativação do sistema complemento leva a amplificação da resposta inflamatória e a eliminação dos agentes patogênicos (Melichar & Freedman, 2002). As células inflamatórias e imunes que residem ou migram para dentro da cavidade peritoneal, as células mesoteliais do peritônio visceral e parietal, os fibroblastos que residem no tecido submesotelial e seus produtos de secreção são a chave na regulação da resposta peritoneal à infecção, inflamação ou injúria celular ou tecidual (Raftery, 1979; Topley *et al.*, 1995; Holmdhal & Ivarsson, 1999). A indução de uma resposta inflamatória devido à infiltração de neutrófilos e monócitos vindos da circulação periférica é uma importante característica de uma reparação tecidual normal (Clark, 1996). Estes monócitos tornam-se ativados e diferenciam-se em macrófagos os quais são as principais fontes de fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas e proteases (Blobe *et al.*, 2000).

A identidade e a precisa natureza das moléculas que estão envolvidas no processo de reparo peritoneal não são ainda conhecidas. No entanto, evidências no estudo da lesão e do fluido peritoneal durante o reparo e a analogia com a cicatrização cutânea levam à hipótese de que a expressão local de fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas, proteases, moléculas de adesão e matriz extracelular, tem um papel crítico nestes eventos (Chegini, 2002).

1.1.1 Células mesoteliais

Em contraste com conceitos prévios de que as células mesoteliais meramente criam uma simples e passiva barreira, o papel ativo dessas células em funções fisiológicas bem como em processos patológicos do peritônio hoje em dia é totalmente aceito.

As células mesoteliais sintetizam quantidades substanciais de fosfatidilcolina, fazendo com que o peritônio permita um deslizamento com menos atrito dos órgãos intraperitoneais. Estas células também são capazes de expressar uma variedade de moléculas de superfície como a molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) e molécula de adesão vascular (VCAM-1), ambas responsáveis por recrutamento e ativação de granulócitos e linfócitos após um estímulo. Dessa forma, as células mesoteliais tem um papel ativo no recrutamento de células inflamatórias após danos ao peritônio e durante inflamação peritoneal (Bittinger, *et al.*, 1998). As células mesoteliais ativadas são capazes de sintetizar mediadores biologicamente ativos, incluindo mediadores pró e anti-inflamatórios, tais como prostaglandinas, quimiocinas, óxido nítrico, fatores de crescimento, ativador de plasminogênio tecidual (tPA), e inibidor do ativador de plasminogênio (Yao, *et al.*, 2003). Além disso, as células mesoteliais criam uma superfície antitrombótica e possuem atividade fibrinolítica (Merlo, *et al.*, 1980; Van Hinsbergh *et al.*, 1990). Em resumo, estas células estão importantemente envolvidas em cicatrização de feridas e na regulação de processos inflamatórios.

1.2 Aderências intraperitoneais

Aderências constituem as principais complicações da cicatrização peritoneal depois de cirurgia, infecção ou introdução de material estranho no abdômen (Ellis, 1997). Se desenvolvem em quase todos os pacientes que sofrem cirurgia abdominal (Luijendijk *et al.*, 1996), e tem sido sugerido que as mesmas podem ser a principal fonte de dor abdominal e pélvica pós operatória (Kresch *et al.*, 1984; Trimpos *et al.*, 1990; Stout *et al.*, 1991), constituindo um

problema importante, com grande impacto na qualidade de vida de milhões de pessoas em todo o mundo. As aderências são formadas na maioria dos pacientes (83%) submetidos à laparotomia e exibem características de cicatrização anormal tais como depressão do sistema fibrinolítico, superprodução de componentes da matriz extracelular (colágeno), ativação persistente da inflamação e angiogênese (Menzies & Ellis, 1990; Epstein *et al.*, 2006). Outros processos inflamatórios crônicos como artrite reumatóide, doença de Crohn e psoríase, dividem as mesmas características anormais de cicatrização (Podolsky, 2002).

As aderências intraperitoneais são bandas de tecido fibroso dentro da cavidade abdominal como consequência de uma inflamação ou manipulação cirúrgica. Em cirurgias abdominais e ginecológicas, a formação de aderências ainda é a principal causa de complicações pós-operatórias, como dor pélvica crônica, obstrução intestinal, infertilidade e pode levar até mesmo à morte (Cheong, 2001; Liakakos, 2001). Embora as aderências sejam reconhecidas como consequência de cirurgias, pacientes com inflamação pélvica ou endometriose também podem desenvolvê-las. Além disso, a presença de aderências pode aumentar o tempo da operação e o risco de complicações intra-operatórias como sangramento ou lesões a órgãos abdominais (Rajab, *et al.*, 2010; Coleman, *et al.*, 2000; Van Der Krabben, *et al.*, 2000).

O trauma peritoneal resulta em dano mesotelial, desencadeando uma resposta inflamatória local. As células mesoteliais se desprendem da membrana basal, criando áreas desnudas, e desencadeando a produção de um amplo espectro de proteínas biologicamente ativas e de exsudato rico em proteínas. O exsudado peritoneal contém altas concentrações de fibrinogênio assim, a

ativação da cascata de coagulação na cavidade peritoneal resultando na formação de trombina, irá ativar a transformação do fibrinogênio em fibrina. Devido à ativação do sistema fibrinolítico, qualquer depósito intra-abdominal de fibrina pode sofrer lise. Entretanto, após cirurgia abdominal e/ou infecção, o equilíbrio entre coagulação e fibrinólise é afetado em favor do sistema de coagulação (Holmdahl *et al.*, 1996). Desse modo, a fibrina forma depósitos que servirão de matriz para a proliferação de tecido fibro-colagenoso e, portanto, levando à formação de aderências.

1.2.1 Inflamação, angiogênese e fibrose

De uma maneira geral, danos tissulares de qualquer natureza (física, química ou biológica) desencadeiam de imediato uma série de eventos inflamatórios que de forma simplista se traduzem como rubor, tumor, calor e dor. Esses sinais resultam da ativação de células nervosas, estromais, vasculares e circulatórias por estímulos físicos ou por sinalização e por ação de mediadores inflamatórios pré-formados (Kumar *et al.*, 2005).

Modificações na microcirculação, tais como os fenômenos angiogênicos, a migração de leucócitos através do leito vascular e a liberação de moléculas solúveis nos tecidos danificados são as principais características da inflamação. A inflamação classificada como aguda é uma resposta imediata e precoce a um agente agressor nocivo e faz parte de uma imunidade inata induzida e de curta duração (horas ou um a dois dias). É caracterizada por alteração da permeabilidade vascular com exsudação de líquidos e proteínas plasmáticas (edema), liberação de mediadores inflamatórios e migração de leucócitos

polimorfonucleares (PMN) para o sítio da lesão. Uma vez que o agente agressor é contido, ocorrerá diminuição da resposta inflamatória e a reparação tissular. Caso contrário, haverá um recrutamento contínuo e ativação de células mononucleares, levando à cronicidade do processo (Wahl *et al.*, 1992; Kubes, 2002). A fase crônica pode ser caracterizada como de duração prolongada (semanas a meses) na qual se observa presença de linfócitos e macrófagos, proliferação de vasos sanguíneos, fibrose e destruição tecidual. A ativação contínua de células mononucleares provoca um aumento da produção e secreção de citocinas inflamatórias, as quais amplificam e perpetuam a resposta à lesão (Kubes, 2002). Os fibroblastos, em cooperação com as células inflamatórias, anteriormente ativadas, serão os protagonistas da fibroplasia (produção de colágeno pelos fibroblastos) e deposição de matriz extracelular (Singer & Clark, 1999).

Os macrófagos podem ser subdivididos em M1 e M2 com relação ao seu perfil metabólico e funcional (Mills *et al.*, 2000). Nos macrófagos M1, o metabolismo da arginina é caracterizado por alta expressão da enzima NO-sintase (iNOS), com conseqüente produção de níveis elevados de óxido nítrico (NO) em resposta aos lipopolissacarídeos (LPS) ou interferon- γ (INF- γ). Nos macrófagos denominados M2, a via da arginase, com geração de ornitina e poliaminas, é predominante (Gordon e Taylor, 2005).

Mediadores diferentes podem estimular os macrófagos a expressarem dois fenótipos funcionais distintos. Lipopolissacarídeo (LPS) e interferon gama (INF- γ) estimulam um perfil clássico ou M1 nos macrófagos (Mosser & Edwards 2008; Gordon 2003), enquanto as interleucinas 4 (IL-4) e 13 (IL-13) estimulam um perfil de macrófagos alternativamente ativados ou M2 (Gordon 2003).

Macrófagos M1 exibem propriedades antimicrobianas pela liberação de mediadores inflamatórios como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), óxido nítrico (NO), e IL-6. Macrófagos M2 suprimem respostas imunes adaptativas e reações inflamatórias e tem um papel importante na cicatrização de feridas e angiogênese, podendo também estar envolvidos em diferentes doenças, como asma, alergia e fibrose (Duffield 2003). A ativação de cada um dos fenótipos leva a um perfil de produção de citocinas e expressão gênica diferente, onde o gene para a enzima iNOS, produtora de óxido nítrico, está mais expresso em macrófagos M1 e os genes FIZZ1 e YM1 são marcadores para macrófagos M2. O gene para a citocina inflamatória IFN- γ também é utilizado como um marcador para macrófagos M1, por estar envolvido no direcionamento para a via clássica de ativação destas células (Gordon, 2003).

Uma vez ativados, os macrófagos são capazes de produzir moléculas moduladoras que podem influenciar as células endoteliais bem como apresentarem uma ação autócrina. Dentre elas estão fatores de crescimento, como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e o fator de crescimento transformante beta (TGF- β), citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e quimiocinas. Esses mediadores tem função de atrair mais células inflamatórias, endoteliais, fibroblastos e células musculares lisas para o local da lesão. Os linfócitos aparecem na região lesada em uma fase mais tardia, mas não são consideradas as principais células envolvidas na cicatrização (Diegelmann *et al.*, 1981). É interessante ressaltar que os leucócitos, além de induzir a angiogênese, permitindo o recrutamento de mais células inflamatórias, também exercem importante papel na modulação do crescimento de novos

vasos sanguíneos por produzirem fatores pró e anti-angiogênicos (McCourt *et al.*, 1999; Crowther *et al.*, 2001; Lingen, 2001; Benelli *et al.*, 2002).

Devido à alta atividade metabólica no sítio inflamatório, há uma crescente demanda de oxigênio e nutrientes. Fatores locais do microambiente como o baixo pH, a redução da tensão de oxigênio e o aumento dos níveis de lactato, efetivamente, iniciam a liberação de fatores necessários para estimular o surgimento de novo suprimento sanguíneo (Knighton *et al.*, 1983; Lavan *et al.*, 1990). A angiogênese ou neovascularização é definida como o processo de formação de novos vasos sanguíneos a partir de pequenos vasos pré-existentes, sendo regulado por diversos fatores ativadores angiogênicos, incluindo o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento básico de fibroblastos (bFGF) e TGF- β (Fachinger *et al.*, 1999; Yancopoulos *et al.*, 2000). Estes fatores são produzidos por células epidérmicas, fibroblastos, macrófagos e células endoteliais e interagem com glicosaminoglicanos e proteoglicanos, presentes na matriz extracelular, na lamina basal e em receptores de superfície celular, regulando o crescimento, a proliferação, a migração, a diferenciação e a sobrevivência das células endoteliais (Solimente *et al.*, 1999; Chipperfield *et al.*, 2002). A baixa tensão de oxigênio também estimula a expressão de um fator nuclear de transcrição denominado fator induzido por hipóxia (HIF) pelas células do endotélio vascular (Gerber, 1997). O HIF, por sua vez, regula a expressão de VEGF o qual estimula a angiogênese. Desequilíbrios, entre o suprimento de oxigênio e a demanda metabólica das células podem resultar em indução da angiogênese em diferentes tecidos (Agocha *et al.*, 1997). É possível perceber uma sincronia e sinergismo entre inflamação e angiogênese em uma variedade

de condições patológicas, atuando de forma concomitante para a manutenção da doença.

Com a evolução da inflamação para a fase proliferativa, os fatores de crescimento mais importantes que iniciarão a resposta cicatricial são o PDGF e o TGF- β (Kim *et al.*, 1998). O TGF- β liberado pelas plaquetas, macrófagos e linfócitos, torna-se um sinalizador crítico, mestre das funções dos fibroblastos (Roberts & Sporn 1993) e tem um efeito triplo na deposição da matriz extracelular. Primeiro, ele aumenta a transcrição de genes para o colágeno, proteoglicanos e fibronectina aumentando desta forma a produção de proteínas da matriz. Segundo, o TGF- β diminui a secreção de proteases responsáveis pela degradação da matriz e finalmente estimula a produção do inibidor de proteases e do inibidor tecidual de metaloproteases (TIMP) (Hall *et al.*, 2003). O fibroblasto é uma célula de origem mesenquimal responsável por produzir uma nova matriz necessária para restauração estrutural e funcional do tecido lesado. Os fibroblastos aderem à matriz provisória de fibrina e iniciam a produção de colágeno (Clark, 2001). O colágeno depositado inicialmente é mais fino que o colágeno de um tecido sem lesão e está orientado verticalmente. Com o passar do tempo, o colágeno inicial é reabsorvido e um colágeno mais grosso é depositado e organizado paralelamente às linhas de tensão. Essas alterações são acompanhadas também por um aumento da força tensil da cicatriz indicando uma correlação positiva com a espessura do colágeno/orientação e força tensil. É importante ressaltar que nenhuma das fases do processo de cicatrização ou formação de aderências, incluindo inflamação, reparo e remodelamento, correspondem a um período definido e todas elas se sobrepõem em parte no tempo e espaço (Eming *et al.*, 2007).

A fibrose, é definida como uma deposição excessiva de componentes da matriz que resulta em alteração da arquitetura normal do tecido e comprometimento da função tecidual e parece seguir uma via similar a da cicatrização de feridas. Contudo, em muitos casos há a progressão crônica da doença, culminando em uma deposição exacerbada de componentes da matriz extracelular pela persistência do estímulo lesivo. A fibrose parece ser determinada por três fatores: 1) estímulo contínuo; 2) síntese excessiva de colágeno e outros componentes da matriz extracelular e, 3) redução da atividade de proteases (Mohammed *et al.*, 2003).

Muitas doenças fibróticas crônicas, apesar de diferenças etiológicas e clínicas, têm em comum um agente persistente que sustenta a produção de fatores de crescimento, enzimas proteolíticas, fatores angiogênicos e citocinas fibrogênicas, os quais estimulam a deposição de matriz remodelando e destruindo progressivamente a arquitetura normal do órgão (Wynn, 2008).

1.2.2 Fisiopatologia da formação de aderência peritoneal

Estudos pioneiros sugeriram que as aderências funcionavam como pontes vasculares entre órgãos saudáveis e áreas com tecidos isquêmicos (Ellis, 1962). Mais recentemente, estudos morfofuncionais têm revelado vários componentes bioquímicos, histológicos e moleculares destes tecidos.

A patogênese da aderência envolve três importantes processos induzidos pelo trauma ao peritônio: (1) inibição do sistema fibrinolítico e de degradação da matriz extracelular (MEC) (Holmdahl *et al.*, 1998; Ivarsson *et al.*, 1998); (2) incita a resposta inflamatória com produção de citocinas, principalmente TGF- β , um regulador chave da fibrose (Holmdahl *et al.*, 2001; Chegini *et al.*, 2001; Cheong

et al., 2003), e (3) também induz a hipóxia tecidual como resultado da interrupção do suprimento sanguíneo para as células mesoteliais e fibroblastos submesoteliais, levando ao aumento da expressão de HIF- α e VEGF, responsável pela produção de colágeno e angiogênese (Segura *et al.*, 2007).

No início da lesão peritoneal, uma cascata de eventos é ativada e esta lesão é invadida por vários elementos celulares, incluindo células mesoteliais, plaquetas, leucócitos PMN e macrófagos. A primeira etapa compreende os processos de homeostasia e resposta inflamatória aguda. A lesão do endotélio estimula a ação plaquetária, que libera citocinas para o reparo tecidual e ativam a cascata de coagulação. Após a homeostasia ser atingida com a formação do trombo, ocorre a migração de PMN. Quanto maior for o número de PMN, maior será a produção de citocinas e fatores de crescimento que, através da ativação de receptores específicos, irá ativar a neovascularização e a migração e proliferação de fibroblastos. Juntos, estes processos coordenam a deposição de fibrina que ocorre desde o início da lesão. O depósito de fibrina formado, associado com as células inflamatórias representam uma superfície adesiva, a qual pode ser degradada pelas propriedades fibrinolíticas das células mesoteliais sob condições normais ou em casos de lesões limitadas (Kuijper, *et al.*, 1997).

Entretanto, lesões extensas, isquemia local e ausência de uma atividade fibrinolítica adequada do mesotélio após um trauma peritoneal levam a um desequilíbrio no balanço fibrinolítico em favor da formação de coágulos de fibrina. (diZerega, 2000; Hellebrekers, *et al.*, 2005; Scott-Coombes, *et al.*, 1995; Wiseman, *et al.*, 1998). Como consequência, a inibição da fibrinólise favorece a predominância de superfície pró-adesiva e, assim, alças intestinais vizinhas ou a parede pélvica e abdominal podem aderir, gerando uma ponte de fibrina entre

os tecidos próximos (Buckman, *et al.*, 1976; Holmdahl, 1999). Sob a ação de várias citocinas estas bandas de fibrina são transformadas em tecido de granulação, com crescimento de capilares e influxo de fibroblastos, sendo subsequentemente convertido em um tecido permanente, colagenoso e altamente organizado contendo fibras nervosas e vasos (diZerega, & Campeau, 2001; Diamond, *et al.*, 2005; Thaler, *et al.*, 2005).

Normalmente, a atividade do ativador de plasminogênio (PA), presente nas células mesoteliais e fibroblastos submesoteliais, degradam a massa de fibrina, resultando em cicatrização da superfície peritoneal (dentro de 3 a 5 dias) sem formar aderência. Entretanto, se os níveis de PA estão diminuídos, a massa de fibrina persiste e os fibroblastos subjacentes migram para o tecido fibrinoso neoformado e depositam matriz extracelular, incluindo colágeno e fibronectina, levando à formação de aderências. Ao longo do tempo, a aderência pode fornecer uma estrutura para o crescimento vascular durante o processo de angiogênese. (Cheong *et al.*, 2001; diZerega & Campeau, 2001; Alpay *et al.*, 2008)

A formação de aderências, como todo processo de reparo e cicatrização, é dependente de angiogênese, tendo como maiores estímulos os tecidos isquêmicos, processos inflamatórios, fatores de crescimento e citocinas como VEGF e TNF- α , e quimiocinas. A angiogênese fornece nutrientes e O₂ para o tecido de granulação, além de facilitar a migração de células inflamatórias. O infiltrado inflamatório por sua vez, proporciona um aumento das substâncias pró-inflamatórias, pró-angiogênicas e pró-fibrogênicas estimulando ainda mais o crescimento vascular, favorecendo a formação de aderências (Molinas *et al.*, 2006).

Estudos têm demonstrado que durante a fase aguda da resposta inflamatória, as células mesoteliais e macrófagos peritoneais produzem uma variedade de citocinas, incluindo TGF- β 1, TNF- α , interleucina-1 (IL-1) e IL-6. Estas citocinas pró-inflamatórias, individualmente e sinergicamente, estimulam a produção do inibidor do ativador de plasminogênio-um (PAI-1) e reduz a síntese do ativador de plasminogênio tecidual (tPA) pelas células mesoteliais humanas (Cheong, *et al.*, 2001; Haney 2000; Gorvy *et al.*, 2005; Whawell & Thompson, 1995). O TGF- β não somente interage com o sistema fibrinolítico e com a MEC, como também com muitos outros mediadores celulares envolvidos no processo de formação das aderências. A superexpressão deste fator de crescimento pelo peritônio, bem como um aumento da concentração de TGF- β no fluido peritoneal, tem sido associada com o aumento da incidência de formação das aderências, tanto em humanos como em animais (Chegini *et al.*, 1997; Ghellai *et al.*, 2000).

Várias linhas de evidência têm demonstrado que a hipóxia tecidual peritoneal tem um papel importante na formação das aderências (Bourdel *et al.*, 2007; Molinas *et al.*, 2001; Saed *et al.*, 2005; Matsuzaki *et al.*, 2007). A hipóxia modula negativamente as vias envolvidas na formação de aderências, diminuindo tPA e aumentando a expressão de PAI em fibroblastos peritoneais humanos *in vitro* (Saed *et al.*, 2003) e *in vivo* (Matsuzaki *et al.*, 2007). Assim, diminui os níveis de plasmina e inibe a lise de fibrina, o que aumenta a formação das aderências. Além disso, também induz proliferação enquanto inibe apoptose em fibroblastos presentes na aderência, e aumenta a produção de VEGF através da ativação de HIF- α em células mesoteliais humanas (Wiczuk *et al.*, 1998) e em aderências animais (Molinas, 2003).

Estratégias terapêuticas únicas têm falhado em prevenir completamente a formação de aderências intraperitoneais devido à natureza multifatorial da patogênese da aderência (Diamond *et al.*, 2010). Como estas etiologias multifatoriais agem independentes e sinergicamente, é imperativo tratar simultaneamente as principais alterações moleculares, incluindo redução de tPA e o aumento de TGF- β e HIF- α , para que qualquer estratégia terapêutica seja bem sucedida. Ainda assim, as abordagens atuais preventivas para reduzir o trauma cirúrgico, ou o uso de barreiras físicas, administração de agentes farmacológicos únicos ou terapia gênica falharam em alcançar resultados satisfatórios. Portanto, a atenuação ou inibição de um ou mais componentes envolvidos nesses processos responsáveis pela formação de fibrose peritoneal, representa um ponto chave no desenvolvimento de estratégias para prevenir a formação de aderência intraperitoneal.

1.3 Modelo de aderência induzida por implantes de esponja

O modelo de implante subcutâneo de matrizes sintéticas (esponjas) em animais foi descrito inicialmente por Grindlay & Waugh (1951) e modificado por Andrade *et al.*, em 1987. A implantação de esponjas induz uma deposição de matriz conjuntiva, neoformação vascular e infiltração leucocitária. Assim, processos naturais como a cicatrização podem ser mimetizados utilizando-se esse modelo. Outros fatores como desnutrição, doenças inflamatórias sistêmicas, diabetes e tumores já mostraram afetar o processo de reparo neste e em outros modelos (Andrade *et al.*, 1987; Teixeira *et al.*, 1999; Bradshaw *et al.*, 2001; Ferreira *et al.*, 2004; Belo *et al.*, 2005; Campos *et al.*, 2006). O modelo

também permite o estudo temporal do infiltrado inflamatório, a análise bioquímica dos fluidos coletados, os efeitos de drogas sobre o processo, além de estudos histológicos e morfométricos (Andrade *et al.*, 1987; Bailey, 1988; Barcelos *et al.*, 2004). Utilizando-se essa abordagem metodológica, tem sido possível caracterizar vários componentes envolvidos na neoformação vascular bem como sua associação com eventos inflamatórios (recrutamento e ativação de leucócitos). A avaliação do desenvolvimento de estruturas vasculares na esponja pode ser feita a partir da estimativa do desenvolvimento do fluxo sanguíneo utilizando-se marcador radioativo ou fluorescente (Andrade *et al.*, 1987) ou a partir da dosagem do conteúdo de hemoglobina (índice indireto de vascularização) (Plunkett & Hailey *et al.*, 1990). A análise histológica associada a estudos imunohistoquímicos e morfométricos apresenta-se também, como aliada importante para a avaliação da angiogênese. Estudos realizados em nosso laboratório mostraram que a implantação cirúrgica de matriz esponjosa na cavidade peritoneal também induz intensa aderência de vários órgãos da cavidade peritoneal ao implante (particularmente fígado e intestino). A análise do tecido que infiltrou a matriz esponjosa revelou intensa atividade angiogênica, inflamatória e fibrogênica, além de ter sido detectada neste tecido fibrovascular, a produção de fatores angiogênicos e citocinas inflamatórias (Mendes *et al.* 2007).

1.4 Própolis

A própolis é um material resinoso produzido por abelhas a partir de substâncias coletadas de diversas partes da planta como botões de flores e

brotos, folhas e cascas. Estas substâncias resinosas são misturadas com enzimas presente na saliva das abelhas, como a β -glicosidase, e são parcialmente digeridas e adicionadas à cera de abelha para formar o produto final (Umthong *et al.*, 2011). A coloração pode variar de verde, vermelho até o marrom escuro dependendo do tipo de planta utilizada pela abelha para extrair a própolis (Burdock, 1998).

A própolis verde do Brasil, originária da região central do país, é produzida por abelhas da espécie *Apis mellifera* e abundante em ácidos cafeoilquínicos e em derivados do ácido prenilado cinâmico, sendo formada a partir da coleta de extratos de *Baccharis dracunculifolia*, popularmente conhecida como alecrim-do-campo (Banskota, 2001).

A palavra própolis é derivada do grego onde *pro* significa “em defesa de” e *polis* “cidade”, isto é, em defesa da cidade ou da colméia (Marcucci, 1996). Verdadeiramente, as abelhas usam esta substância para proteger a colméia contra insetos e microrganismos, empregando-a no reparo de frestas ou danos à colmeia (isolamento térmico e contra inimigos), no preparo de locais assépticos para a postura da abelha rainha e na mumificação de insetos invasores. Costuma-se encontrar na colmeia pequenos animais ou parte deles envoltos em própolis, em perfeito estado de conservação (Marcucci, 1996), já que à própolis é também atribuída ação antimicrobiana, o que impede a decomposição do cadáver (Park *et al.*, 1998), sendo considerada uma verdadeira arma química contra microrganismos patogênicos (Falcão *et al.*, 2010).

Ao longo da história, o homem aprendeu a utilizar os produtos naturais na medicina. Das várias formas de utilização destacam-se as plantas brutas (ex. ervas) além das tradicionais preparações galênicas (extratos). A própolis é um

dos muitos produtos naturais utilizados durante séculos pela humanidade e seu uso data de pelo menos 300 a.C. Foi utilizada como remédio na medicina local e popular em muitas partes do mundo. Egípcios, gregos e romanos relataram o uso da própolis por suas qualidades medicinais e pela cura de lesões na pele. Os egípcios também utilizavam este composto para embalsamar os mortos (Ghisalberti, 1979). Os gregos, entre os quais Hipócrates, a adotaram como cicatrizante interno e externo. Plínio, historiador romano, refere-se à própolis como medicamento capaz de reduzir inchaços e aliviar dores, enquanto a elite feminina da época utilizava esta substância no alívio da síndrome pré-menstrual e de cólicas. Para médicos europeus dos séculos XVI em diante, particularmente russos e poloneses, a própolis encontrou emprego como antibacteriano, tuberculostático e agente dermatológico antieczematoso e antiacne. Na odontologia, a própolis era empregada no tratamento de abscesso e gengivas hemorrágicas, bem como nos casos de candidíases bucais e halitoses. A própolis também é encontrada nos receituários chineses antigos como medicamento ativo contra moléstias coronárias e hipertensão (supondo-se atividade hipolipêmica) e disfunções hematológicas (Nothenberg, 1997). Seu uso ainda continua nos dias de hoje em remédios e produtos pessoais, como cosméticos, e também como conservantes de alimentos (Umthong, 2011).

Mais de 300 substâncias já foram identificadas a partir de diferentes amostras de própolis como flavonóides, ácidos fenólicos, ácidos aromáticos, ácidos diterpênicos, constituindo as principais substâncias responsáveis pelas atividades biológicas da própolis (Bankova 2005). A composição deste produto resinoso, suas propriedades físico-químicas, atividades biológicas e uso terapêutico, dependem da vegetação onde as colmeias estão localizadas, do

clima e da variedade da rainha (Quiroga *et al.*, 2006). Apesar das diferenças nas composições, muitas amostras de própolis dividem uma considerável similaridade na composição química de forma geral: 50% resina, 30% cera, 10% óleos essenciais, 5% pólen e 5% de outros componentes orgânicos (Gómez-Caravaca *et al.*, 2006).

Nos últimos anos, a própolis tem sido objeto de estudo intensivo destacando suas propriedades biológicas e farmacológicas, como atividade antibacteriana (Velazquez *et al.*, 2007), antiviral (Schnitzler *et al.*, 2010), antioxidante (Moreira *et al.*, 2008), hepatoprotetora (Banskota *et al.*, 2001) e antitumoral (Valente *et al.*, 2011). A atividade *in vitro* contra bactérias gram-positivas e gram-negativas tem sido descrita, bem como a capacidade, *in vivo*, de reduzir 95% das gengivites (Amaral *et al.*, 2006).

Nakajima e colaboradores (2007) identificaram o ácido cafeoilquinico e derivados (ácido p-cumárico, artepelina C e bacarina) como os principais componentes presentes no extrato aquoso da própolis verde do Brasil, o que foi corroborado por Moura e colaboradores (2011a) na composição química da própolis verde advinda do estado de Minas Gerais, Brasil.

Os métodos de extração da própolis podem influenciar sua atividade, uma vez que diferentes solventes solubilizam um extrato de compostos diferentes. Os extratos mais comuns utilizados nos ensaios biológicos são os preparados com etanol em diferentes concentrações, metanol e água (Cunha *et al.*, 2004). Os extratos etanólico e aquoso da própolis possuem ação antialérgica, inibindo a liberação de histamina em mastócitos peritoneais de ratos (Miyataka *et al.*, 1998). Em modelos imunossupressores, administração do extrato aquoso da própolis (EAP) em camundongos impediu os efeitos da ciclofosfamida e

aumentou a sobrevivência dos animais (Dimov, *et al.*, 1991). Estes autores também sugeriram que a própolis modula a imunidade inespecífica via ativação de macrófagos, bem como estimula a produção de citocinas como IL-1 β e TNF- α , por macrófagos peritoneais de camundongos (Moriyasu, *et al.*, 1994). *In vitro*, estudos mostraram que o EAP inibiu as vias clássicas e alternativas do sistema do complemento (Ivanovska *et al.*, 1995). Foi demonstrado que seis compostos isolados da própolis, identificados como ácido cafeoilquínico e derivados, aumentaram a motilidade e o "spreading" (espalhamento) de macrófagos (Tatefuji *et al.*, 1996). Um indicativo da ativação de macrófagos é a geração de NO pela óxido nítrico sintase (NOS) (Macfarlane *et al.*, 1999), sendo um importante mecanismo microbicida deste tipo celular. Estudos mostraram que a própolis diminuiu a geração de NO por macrófagos peritoneais estimulados com LPS (Moriyasu *et al.*, 1994)

Apesar dos avanços da farmacologia e da biotecnologia no desenvolvimento de drogas novas e potentes para o tratamento de doenças inflamatórias uma das recomendações da Organização Mundial de Saúde é a de se intensificar a pesquisa na busca de novos produtos naturais tais como plantas e minerais (Silveira & Raiser, 1995). Devido às inúmeras propriedades biológicas e farmacológicas demonstradas, a própolis tem despertado o interesse de indústrias farmacêuticas, sendo introduzidas em produtos para consumo humano, como bebidas, alimentos e cosméticos. Porém, apesar de existir trabalhos que evidenciam que os extratos de própolis possuem substâncias capazes de atuar inibindo a resposta inflamatória, seu exato mecanismo antiinflamatório até agora é obscuro necessitando de estudos mais consistentes (Mirzoeva & Calder, 1996).

Considerando as propriedades anti-inflamatórias, anti-angiogênicas e cicatriciais da própolis em vários modelos experimentais e o fato das aderências intraperitoneais apresentarem componentes inflamatórios, angiogênicos e fibrogênicos em sua fisiopatologia, a proposta deste trabalho foi investigar os efeitos deste produto natural em aderências induzidas por implante de esponja em camundongos. O estudo concomitante dos três componentes da aderência (inflamação, angiogênese e fibrose) e seu tratamento pela própolis ainda não tinha sido avaliado.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos do extrato aquoso da própolis verde nos componentes, inflamatório, angiogênico e fibrogênico de aderências intraperitoneais induzidas por implante de esponja em camundongos.

2.2 Objetivos específicos

- ❖ Caracterizar, através de parâmetros bioquímicos e morfológicos os componentes do tecido fibrovascular induzidos por matrizes sintéticas alojadas na cavidade abdominal.

- ❖ Avaliar o efeito do extrato bruto da própolis na angiogênese, inflamação e fibrose das aderências intra-peritoneais.

- ❖ Avaliar o efeito da própolis na produção de citocinas angiogênicas, inflamatórias e fibrogênicas no modelo de aderência.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss machos, de 6 a 8 semanas, pesando 25 a 30 gramas, provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Esses animais foram mantidos em gaiolas individuais e alimentados com ração padrão e água *ad libitum*. O protocolo de aprovação do CETEA foi o de nº 248/2008.

3.2 Implante das esponjas

Discos de esponjas de poliéster (Vitaform Ltd Manchester) de 8 mm de diâmetro e 5 mm de espessura foram previamente confeccionados com a utilização de um punch cirúrgico de 8 mm (Figura 1A-C). Esses implantes se mantiveram conservados em álcool 70% v/v durante as 24 horas anteriores à implantação e, posteriormente, fervidos em água destilada por 15 minutos para esterilização (Andrade *et al.*, 1987).

Para o procedimento cirúrgico, os animais foram anestesiados com solução de cetamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) e submetidos à assepsia e à tricotomia da região abdominal. Em seguida, foi feita uma incisão de aproximadamente 1 cm na linha alba do abdômen, por onde o disco de esponja foi introduzido na cavidade abdominal. A região foi então suturada (Figura 1D) e os animais foram monitorados para observar qualquer reação de desconforto, infecção ou estress (Mendes *et al.* 2009).

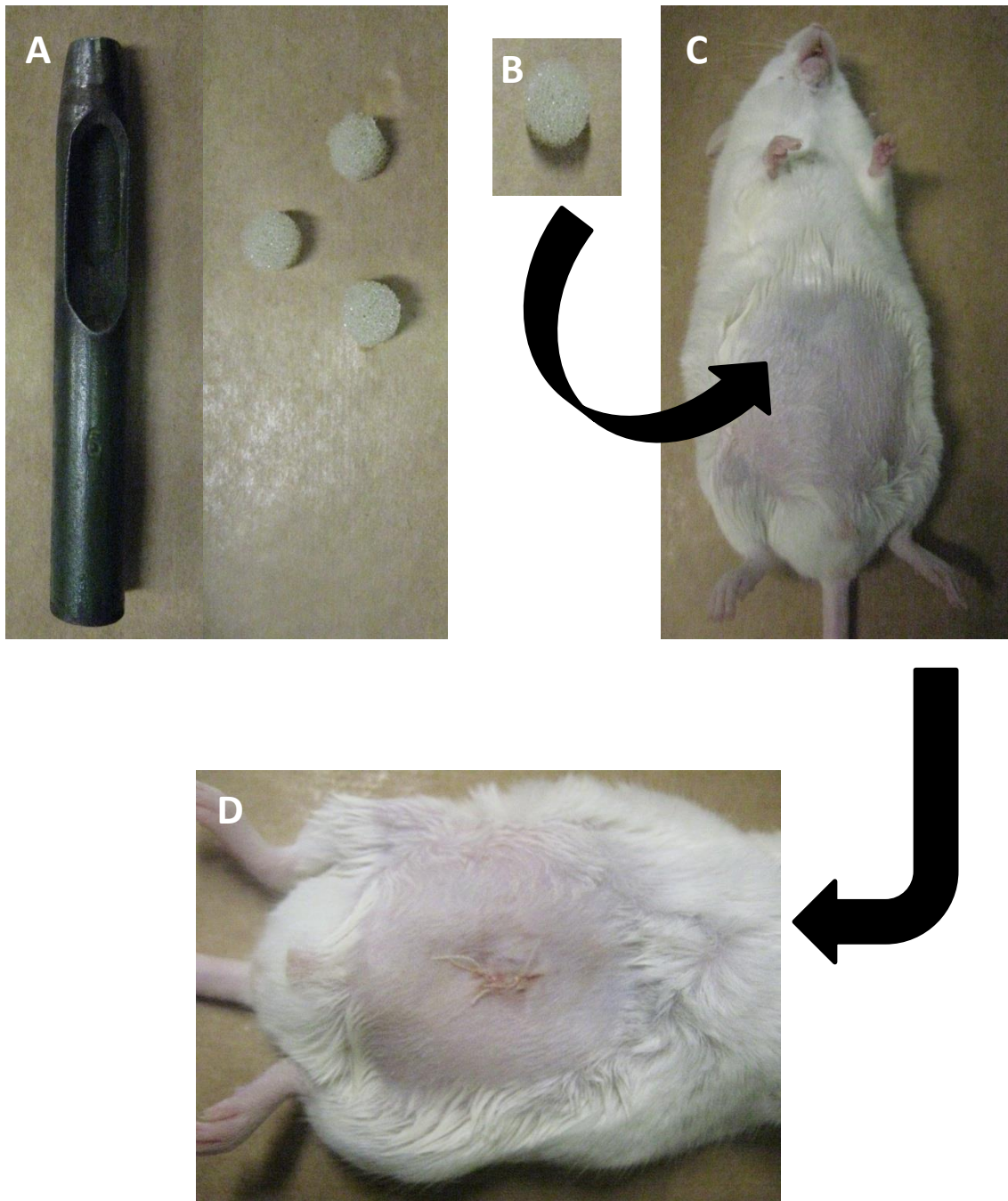


Figura 1 - Confeção dos implantes de esponja e implante na cavidade abdominal. A: punch cirúrgico utilizado para cortar os implantes; B: implante de esponja; C: camundongo com a região abdominal depilada para a cirurgia de implantação da esponja; D: abdômem do animal suturado após cirurgia.

3.3 Obtenção da própolis e tratamento dos animais

A própolis verde utilizada neste trabalho, produzida por abelhas *Apis mellifera* foi coletada em um apiário no município de Jaguaruçu, região leste de Minas Gerais conforme descrito anteriormente por Moura *et al* (2011b).

Após a coleta, a própolis bruta foi triturada, homogeneizada e acondicionada à -18°C. O extrato aquoso foi preparado usando 200g da própolis bruta para 500ml de água destilada. Essa solução foi mantida sob agitação durante aproximadamente 60 min a 70°C, até a completa incorporação da própolis. O material foi posteriormente filtrado para obtenção da 1ª fração do extrato e resíduo. O mesmo procedimento foi repetido com o resíduo para obtenção da 2ª fração do extrato. As frações 1 e 2 foram misturadas e liofilizadas para uso (Moura *et al*, 2011b). A própolis foi então reconstituída em salina 0,9% para administração oral em camundongos.

Os animais receberam uma dose diária de 500 mg/kg do extrato aquoso de própolis verde em 200µl. O tratamento foi iniciado 24 horas pós-implantação e repetido durante 4 dias. Os animais do grupo controle receberam 200µl de solução salina 0,9% seguindo o mesmo protocolo. No 5º dia após a implantação, os animais foram eutanaziados por overdose de anestésico e os implantes removidos, pesados e processados para estudos bioquímicos e histológicos.

3.4 Avaliação do efeito da própolis na inflamação da cavidade peritoneal pelo método de difusão da fluoresceína

Supondo-se que o implante cirúrgico de esponja intraperitonealmente poderia alterar a permeabilidade vascular localmente, utilizamos a técnica de difusão da fluoresceína para avaliar o efeito da própolis na permeabilidade vascular (sinal do processo inflamatório) e na angiogênese induzidas pelos implantes na cavidade abdominal. Esta técnica é utilizada clinicamente para avaliar a vascularização ocular e a drenagem venolinfática e foi adaptada para avaliar a vasculatura cutânea, a angiogênese inflamatória e tumoral em camundongos (Teixeira *et al.*, 2005). Ela baseia-se no princípio de que a intensidade da fluorescência detectada na circulação sistêmica reflete o fluxo sanguíneo no local da aplicação do marcador fluorescente (fluoresceína sódica). Assim, quanto maior o fluxo sanguíneo no local de aplicação, mais rápido é obtido o pico da fluorescência na circulação sistêmica. Para determinar os valores basais da difusão da fluoresceína na cavidade abdominal, animais não implantados foram avaliados. Vinte e quatro horas após a implantação e antes de iniciar o tratamento, os animais foram submetidos ao mesmo procedimento, de maneira a avaliar a permeabilidade vascular através da difusão da fluoresceína. Quatro dias após a cirurgia de implante, os animais foram submetidos novamente à técnica de difusão da fluoresceína a fim de se avaliar o efeito da própolis nos parâmetros vasculares inflamatórios e na angiogênese, no modelo em questão. Foram utilizados 5 animais de cada grupo para se estabelecer esses valores. O delineamento experimental para dosagem da fluoresceína, bem como o tratamento dos animais está mostrado na Figura 2.

O protocolo para avaliação da permeabilidade vascular consistiu em injetar 10µl de fluoresceína sódica 1% (Sigma, USA) na cavidade abdominal dos animais anestesiados. Em tempos previamente determinados (1', 3', 5', 7', 10', 15', 20', 25' e 30'), foram coletados 10µl de sangue da veia da cauda do animal e colocados em 3 ml de salina 0,9%. Após centrifugação por 5 minutos a 3000g, o sobrenadante foi coletado para leitura fluorimétrica. Os resultados foram expressos como pico de fluorescência/min (tempo necessário para a fluorescência atingir a máxima intensidade na circulação sistêmica).

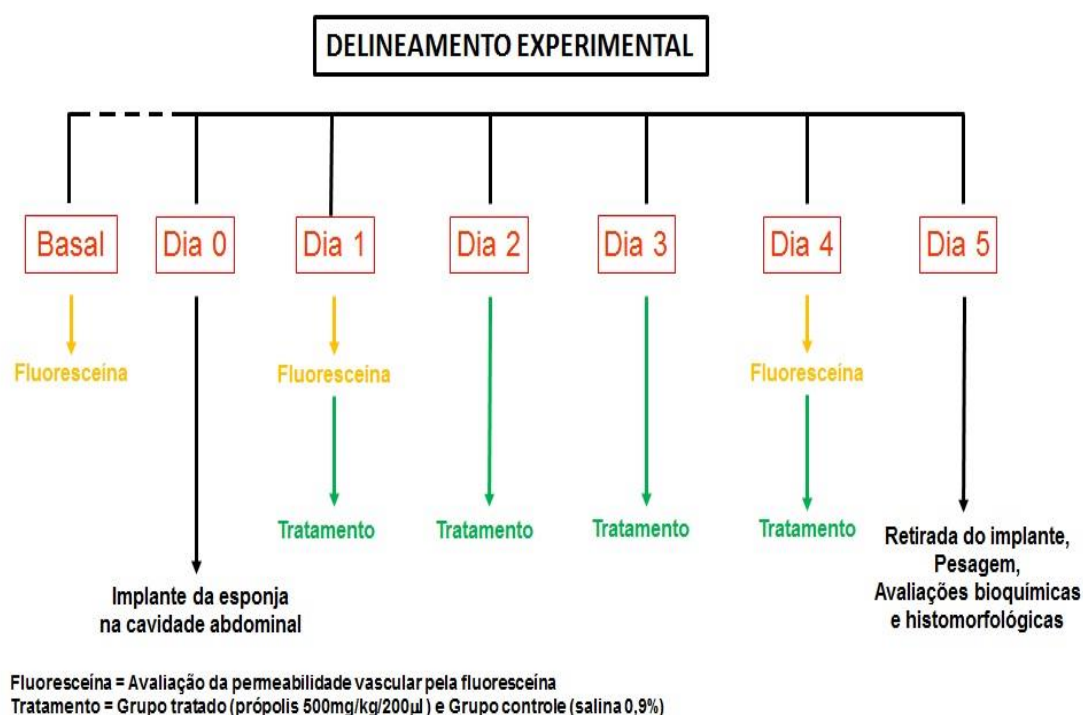


Figura 2 - Tratamento dos animais por gavagem e dosagem da fluoresceína.

3.5 Dosagem de Hemoglobina (Hb)

Esta técnica desenvolvida em 1932 utiliza o método do reagente de Drabkin e foi adaptada para medir o índice de vascularização (Plunkett *et al.*, 1990; Passaniti *et al.*, 1992; Hu *et al.*, 1995; Ferreira *et al.*, 2004; Belo *et al.*, 2005). Ela consiste em uma avaliação ou medida indireta do índice vascular através da dosagem de hemoglobina (Hb) no implante.

Os implantes foram partidos em duas metades e pesados para as dosagens de hemoglobina e colágeno. A metade utilizada para dosagem de Hb foi homogeneizada (Tekmar TR-10, Ohio, USA) em 2,0ml de um reagente cromogênico específico para hemoglobina (Reagente de Drabkin - Kit de Dosagem de Hemoglobina - Labtest), centrifugada por 30 minutos a 15.000 g. O sedimento foi guardado para as dosagens enzimáticas e o sobrenadante utilizado para as dosagens de hemoglobina e citocinas. Um ml do sobrenadante foi filtrado em membranas GV Durapore de 0,22 μ m (Millipore) e, 200 μ l de cada amostra foram colocados em microplacas de 96 poços, em duplicata. A leitura foi feita em espectrofotômetro em comprimento de onda de 540nm. A concentração de hemoglobina de cada amostra foi calculada a partir de uma curva padrão conhecida e os resultados expressos em concentração de hemoglobina em microgramas por miligrama de peso úmido de implante (Hb μ g/mg).

3.6 Quantificação do colágeno

A quantificação de colágeno total solúvel (tipos I-V) (Phillips 2004) baseia-se na interação específica do corante *Picrosirius Red* com o grupo [GLY-X-Y]_n

das sequências de tripla hélice de todos os colágenos nativos. A metade do implante de esponja usada para esta dosagem foi homogeneizada em 1ml de solução salina-triton (NaCl 0,9% com 0,1% de Triton X-100) e centrifugada a 10.000 g durante 10 min. 50 μ l do sobrenadante foi transferido para eppendorf de 1,5ml onde foi adicionado 50 μ l de solução de sirius red F3B (Direct Red 80) a 0,1% em solução saturada de ácido pícrico e incubado por 30 minutos a temperatura ambiente. Seguiu-se de centrifugação a 10.000g por 10 minutos e o sobrenadante foi totalmente descartado por inversão do tubo. O sedimento foi lavado delicadamente com 500 μ l de etanol puro livre de metanol e o complexo colágeno-corante foi solubilizado em 1ml de NaOH a 0,5M. A absorbância foi medida a 540nm em um leitor de microplacas (Thermoplate). A quantidade de colágeno em cada amostra foi determinada através da comparação com uma curva padrão utilizando concentrações conhecidas de colágeno (Merck) e os resultados expressos em microgramas (μ g) de colágeno por miligrama (mg) de implante.

3.7 Avaliação da atividade da Mieloperoxidase (MPO)

Após a dosagem de hemoglobina, uma parte do sedimento obtido foi pesada, solubilizada em 2,0ml de tampão salino fosfato de sódio pH 5,4 (3,0ml Na₂HPO₄.12H₂O a 0,32M; 47,0ml NaH₂PO₄.H₂O a 0,32M) e homogeneizado durante 20 min. O homogeneizado, 50 μ l, foi transferido para eppendorf de 1,5ml e misturado com 300 μ l de HTAB (hexa-1,6-bis-decyltrimethylammonium bromide, Sigma) a 0,5% preparado em tampão fosfato de sódio a 80mM, pH 5,4 e centrifugado a 5.000g, 4°C durante 10 minutos e o sobrenadante utilizado para

a dosagem de MPO. Para o ensaio enzimático foram adicionados a um eppendorf: a) 100 μ l do substrato H₂O₂ a 1,2mM, dissolvido em tampão fosfato de sódio 80mM (pH 5,4); b) 100 μ l de TMB (tetrametilbenzidina, Sigma) na concentração final de 1,6mM preparado em DMSO (dimetilsulfóxido, Merck); c) 200 μ l do sobrenadante das amostras. Seguiu-se incubação durante 1 minuto a temperatura ambiente e a reação foi paralisada pela adição de 100 μ l de H₂SO₄ a 4M. A leitura colorimétrica foi feita a 450nm em leitor de microplaca (Termoplate). Os resultados estão expressos como densidade óptica (OD) por g de tecido úmido (implante).

3.8 Avaliação da atividade da N-acetil- β -D-glicosaminidase

(NAG)

A outra parte do sedimento, remanescente após da dosagem de Hb, foi pesada e utilizada neste ensaio para detectar os níveis dessa enzima. Os sedimentos foram homogeneizados em 2ml de solução de NaCl (0,9% w/v) contendo 0,1% v/v de Triton X-100 (Promega) e centrifugados a 3000g por 10min a 4°C. Amostras do sobrenadante (100 μ l) foram incubadas por 10 min a 37°C com 100 μ l p-nitrofenil-N-acetil- β -D-glucosamina (Sigma), na concentração final de 2,24mM preparado em tampão citrato/fosfato de sódio, pH 4,5 (200ml ácido cítrico a 0,1M; 310ml Na₂HPO₄ a 0,1M). A reação foi paralisada pela adição de 100 μ l de tampão glicina a 267mM, pH 10.6 (misturar volumes iguais de glicina a 800mM; NaCl a 800mM; NaOH a 800mM). A absorbância foi medida em espectrofotômetro a 405nm. Os resultados estão expressos em nanomol (nmol) por miligrama de tecido.

3.9 Quantificação das citocinas (VEGF, TNF- α , TGF- β 1)

Para a determinação destas citocinas nos implantes foi utilizado 80 μ l do sobrenadante restante da dosagem de Hemoglobina. Para realização do ensaio, seguiu-se os protocolos padronizados pelo fornecedor do Kit DuoSet Murine Immunoassay (R&D Systems – Mineapolis, MN).

Neste protocolo, o sobrenadante livre de células foi diluído, adicionado à placa de ELISA sensibilizada com anticorpo de captura específico para a citocina a ser avaliada e incubado a 4°C por uma noite. Após lavagens foi adicionado à placa o tampão de bloqueio e incubado durante 1 hora para bloquear sítios de ligação inespecíficos. Após lavagem foram adicionados o padrão de citocina a ser dosada e as amostras, seguiu-se nova incubação a 4°C durante uma noite. A placa foi lavada e 100 μ l de anticorpo de detecção biotilado contra a citocina foi adicionado e incubado por 2 horas. Após lavagens, 100 μ l do conjugado estreptavidina-peroxidase foi adicionado e incubado durante 30 min. à temperatura ambiente. Após nova lavagem, 100 μ l de OPD (o-fenilenodiamina – Sigma) diluído em tampão citrato a 30mM, pH 5,0 contendo 0,02% de H₂O₂ 30v/v foi adicionado. A placa foi incubada abrigada da luz durante 30 min. A reação foi interrompida por adição de 50 μ l/poço de ácido sulfúrico a 2N. A leitura das placas foi feita em espectrofotômetro a 492nm e os resultados foram expressos como picograma (pg) de citocina por miligrama (mg) de peso úmido de tecido, usando uma curva padrão para cada citocina dosada.

3.10 Análise da expressão de genes associados com a ativação de macrófagos

A fim de determinar a expressão dos genes associados com a ativação clássica e alternativa de macrófagos, esponjas implantadas na cavidade abdominal de camundongos tratados durante 4 dias com própolis e controle foram analisadas. O RNA total foi obtido usando Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) de acordo com o procedimento explicado pelo fabricante. O RNA total foi transcrito de maneira reversa com SuperScript III (Invitrogen). O PCR quantitativo em tempo real foi realizado em um sistema de detecção de um passo ABI PRISM (Applied Biosystems, Carlsbad, CA) usando SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). O nível de expressão relativa dos genes foi determinado pelo método $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ e os resultados foram normalizados pelos níveis de expressão da subunidade ribossomal 18S. Todas as reações foram replicadas. Os iniciadores foram gerados para iNOS (sequência senso: AGCACT TTG GGT GAC CAC CAG GA, anti-senso: AGC TAA GTA TTA GAG CGG CGG CA), INF- γ (sequência senso: ACA ATG AAC GCT ACA CAC TGC AT, sequência anti-senso: TGG CAG TAA CAG CCA GAA ACA), FIZZ1 (sequência senso: ACC TTT CCT GAG ATT CTG CCC, anti-senso CAG TGG TCC AGT CAA CGA GTA AGC), YM1 (sequência senso: GGC TAC ACT GGA GAA AAT AGT CCC, anti-senso: CCA ACC CAC TCA TTA CCC TGA TAG) e 18S (sequência senso: CGT TCC ACC AAC TAA GAA CG, anti-senso: CTC AAC ACG GGA AAC CTC AC).

3.11 Avaliação histológica

Os implantes intraperitoneais dos grupos controle e tratados foram retirados no 5º dia após a cirurgia e fixados em formalina tamponada (10% aldeído fórmico em PBS pH 7,4) e incluídos em parafina. Foram feitos cortes histológicos de 5µm e corados com tricrômico de Gomori.

3.12 Análise estatística

Os resultados estão apresentados como média± e.p.m. e todos os dados analisados foram submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. O teste “*t*” de Student foi utilizado para fazer a comparação entre dois grupos para dados não pareados. Os resultados foram considerados significativos para $p < 0,05$. O programa de estatística usado foi o GraphPad Prism 4.0.

4 RESULTADOS

Os animais não apresentaram qualquer sinal clínico de reação adversa ao tratamento com a própolis (sedação, prostração, inapetência, alterações motoras ou intoxicação). Os procedimentos cirúrgicos para implante dos discos de esponja foram bem tolerados pelos animais, e não apresentaram sinais de infecção e rejeição, embora tenham induzido a formação de um tecido semelhante à aderência, no qual podem ser observados vasos e fibrose (Figura 3A). Os implantes estavam envolvidos em uma cápsula fibrosa e firmemente aderidos a órgãos viscerais (fígado e/ou intestino) após 5 dias. A Figura 3B e C mostra o aspecto dos discos de esponja respectivamente antes e depois da implantação.

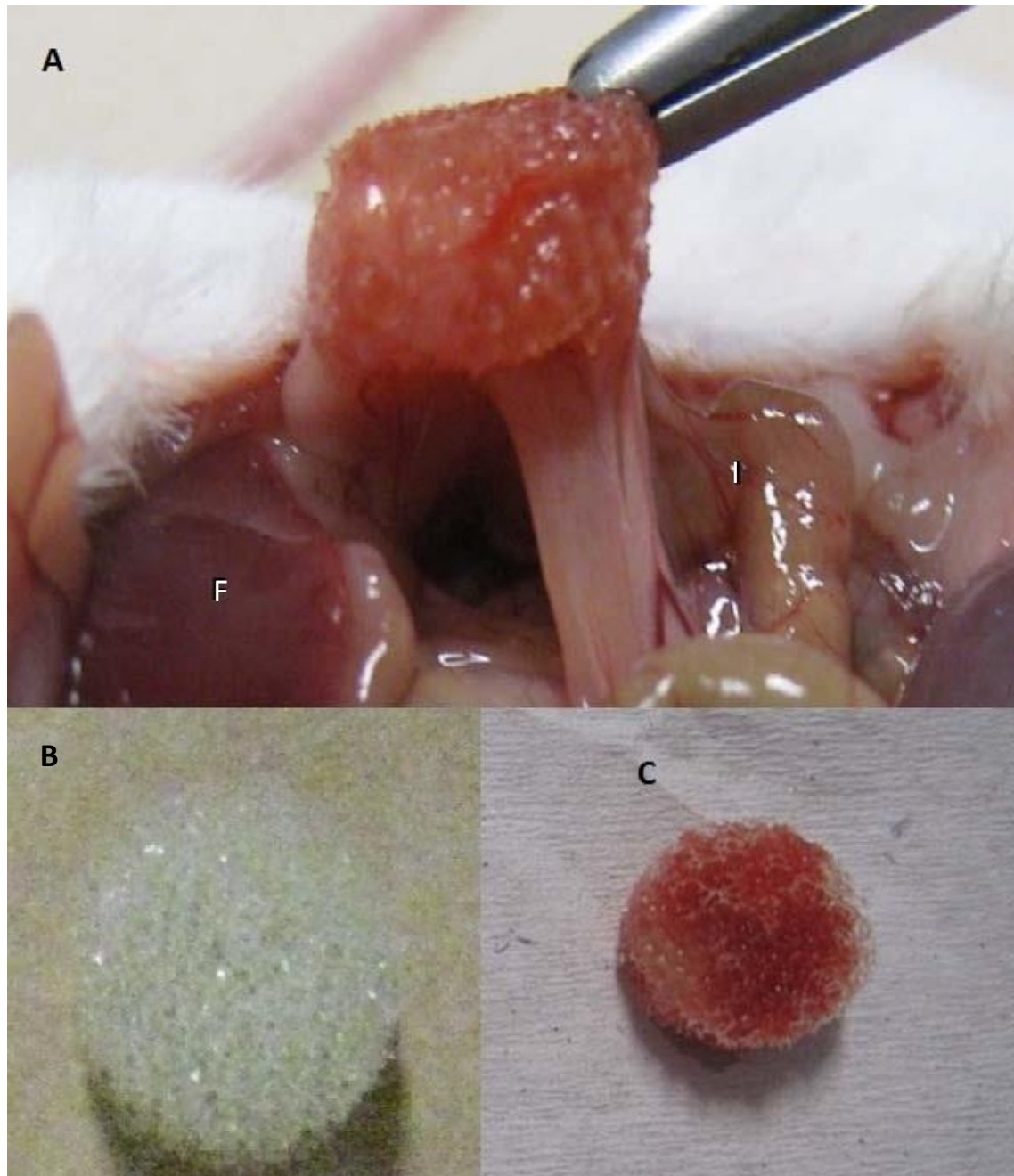


Figura 3 - Aderência após 5 dias e aspecto do implante de esponja na cavidade abdominal, no qual podem ser observados a formação de vasos e tecido conjuntivo (A). Aspecto da esponja antes do implante (B) e depois de ser retirado da cavidade abdominal (C). F= fígado; I= intestino

4.1 Reatividade Vascular

O processo inflamatório induzido pelo implante de esponja na cavidade abdominal causou uma queda no tempo de difusão da fluoresceína em relação aos valores do pico de difusão basal do marcador fluorescente. Quatro dias após a implantação o pico da fluorescência permaneceu menor, em torno de 10 minutos, no grupo controle. Já no grupo tratado com própolis, obteve-se um pico médio de $20,8 \pm 3$ minutos, mostrando um retardo na difusão da fluoresceína pela circulação sanguínea. Desse modo, o tempo para atingir a máxima intensidade da fluoresceína na circulação sistêmica, foi maior nos animais tratados com própolis quando comparado com os animais controle, no tempo de 4 dias, refletindo uma diminuição da difusão (Figura 4).

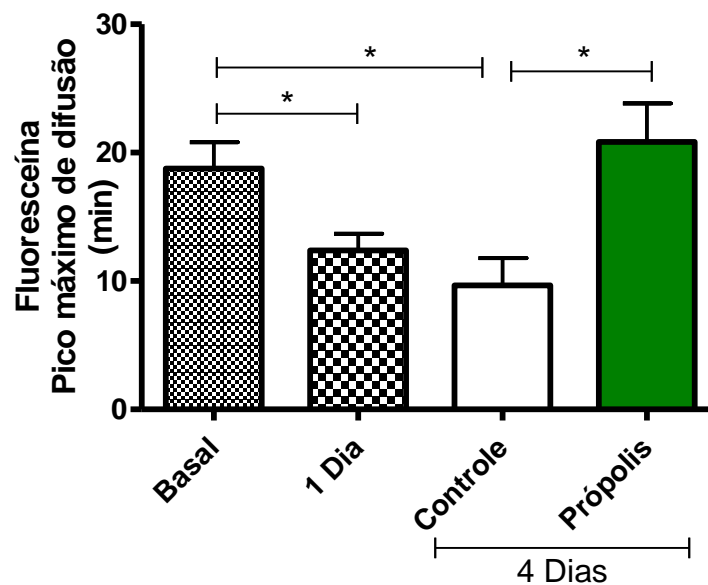


Figura 4 - Pico máximo de difusão da fluoresceína. Basal: valores obtidos antes da cirurgia de implante da esponja. 1 dia: valores 24 horas após o implante e antes do primeiro dia de tratamento com própolis. Para os grupos controle e própolis, a coleta de sangue foi feita no 4º dia após implantação da esponja. * $p < 0,05$

4.2 Análise do peso e do índice vascular

Para avaliar os componentes encontrados no implante, como edema, infiltrado celular, vasos e matriz extracelularas esponjas foram retiradas no 5º dia, pesadas e comparadas entre os dois grupos.

A análise do conteúdo de hemoglobina (Hb) e a quantificação da citocina VEGF, parâmetros indiretos analisados para avaliar o índice vascular, foram utilizados para estudo da angiogênese nos implantes de esponjas dentro da cavidade abdominal.

O grupo tratado com própolis ($207\pm 5,9$) apresentou o peso do implante significativamente menor em relação ao grupo controle ($227\pm 5,1$) (Figura 5).

Analisando o conteúdo de hemoglobina, o grupo tratado ($8,36\pm 0,85$) mostra uma diminuição deste componente em relação ao controle ($11,79\pm 1,26$) de aproximadamente 29% (Figura 6A). Por outro lado, o tratamento com a própolis aumentou os níveis de VEGF em 42% ou seja de $112,8\pm 5,92$ para $159,7\pm 18,74$ (Figura 6B).

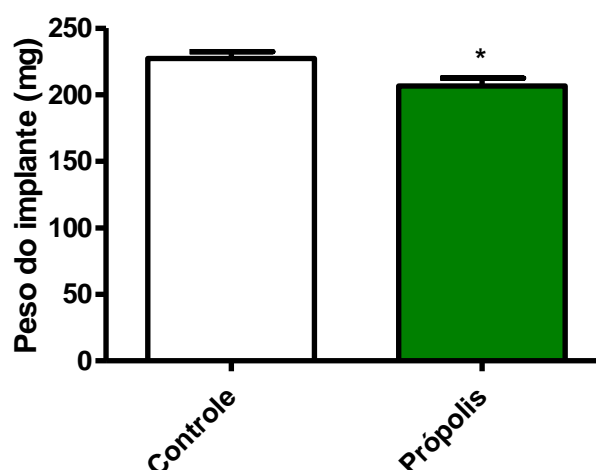


Figura 5 - Peso das esponjas após 5 dias de implante. O grupo tratado com própolis apresentou diminuição de aproximadamente 9% do peso em relação ao controle. * $p < 0,05$.

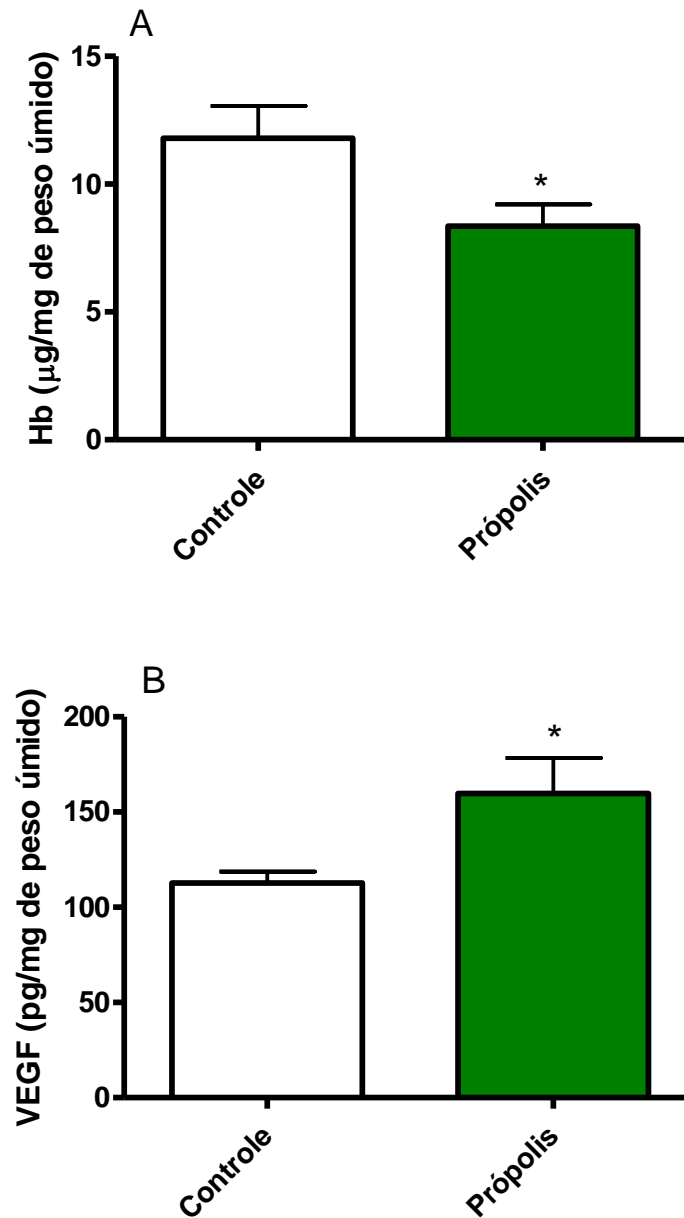


Figura 6 - Análise dos parâmetros angiogênicos da aderência intraperitoneal. (A) Conteúdo de hemoglobina intra-implantes e (B) citocina VEGF medida nos implantes de esponja. Os animais tratados com própolis mostraram uma diminuição no conteúdo de hemoglobina de 29% e um aumento nos níveis de VEGF de 42%. * $p < 0,05$.

4.3 Avaliação dos parâmetros fibrogênicos

A deposição de matriz extracelular foi avaliada através da citocina TGF- β e do conteúdo de colágeno encontrados no implante. Estes parâmetros estão

diretamente relacionados à fibrose. Nos animais tratados com a própolis o TGF- β 1 ($135,6\pm 26,70$) e o colágeno ($0,94\pm 0,18$), foram respectivamente 49% e 38% ($p < 0,05$) menores que nos animais controle os quais apresentaram $265,9\pm 41,63$ para o TGF- β 1 e $1,51\pm 0,12$ para o colágeno (Figura 7A e B).

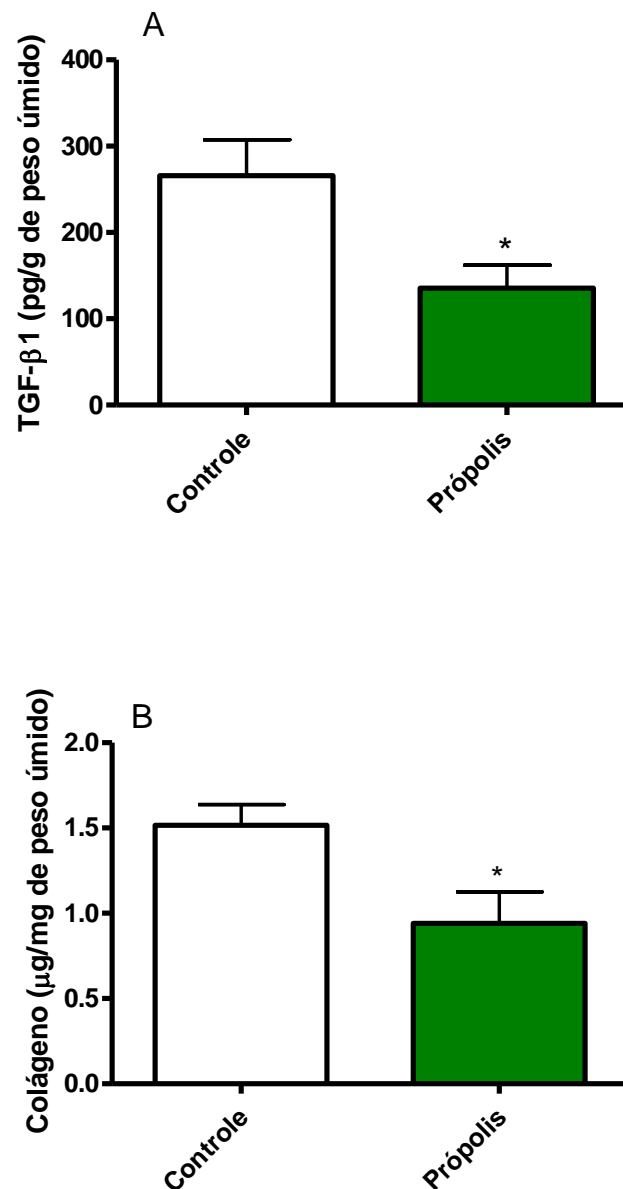


Figura 7 - Avaliação do TGF- β 1 e da deposição de colágeno dos implantes na cavidade abdominal. A: concentração de TGF- β 1; B: avaliação do colágeno. O TGF- β 1 e o colágeno foram estatisticamente menores nos animais tratados com própolis, 49% e 38% respectivamente em relação ao grupo controle. * $p < 0,05$

4.4 Avaliação dos componentes inflamatórios

O recrutamento leucocitário foi avaliado através da atividade das enzimas MPO e NAG, as quais são parâmetros para avaliação indireta da ativação de neutrófilos e macrófagos, respectivamente, no sítio inflamatório. A citocina inflamatória TNF- α também foi mensurada, uma vez que está diretamente relacionada ao recrutamento e ativação de células inflamatórias. Foi observado um aumento de 79% (controle 17.18 ± 3.903 vs tratado 30.83 ± 4.752) na atividade de MPO e 37% (controle 20.50 ± 2.194 vs tratado 28.14 ± 1.457) no NAG nos animais do grupo tratado com própolis (Figura 8A e B). A produção de TNF- α mostrou-se 136% maior (controle 536.0 ± 95.68 vs tratado 1263 ± 188.6) nos animais tratados em relação ao controle (Figura 9).

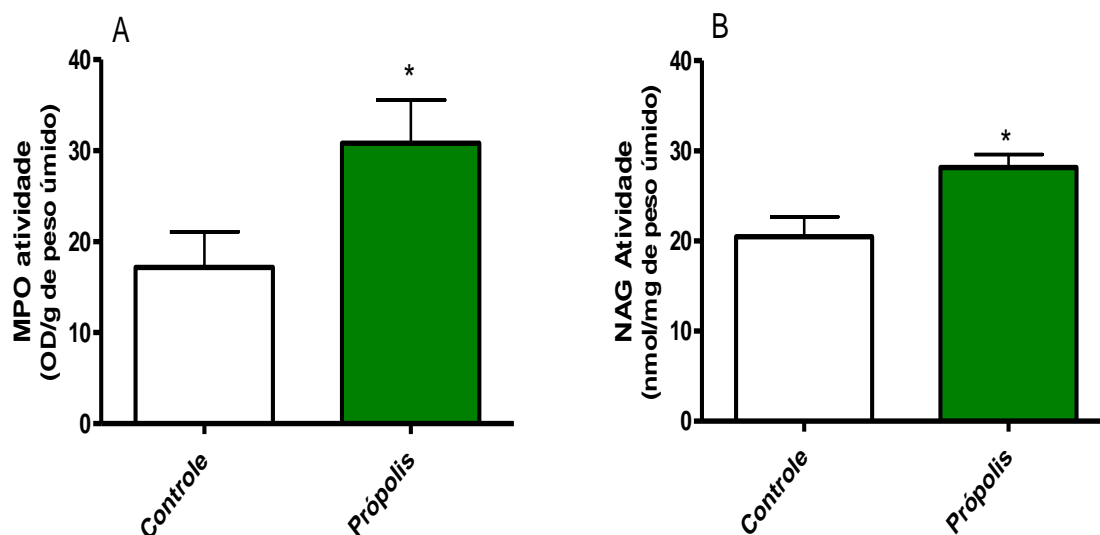


Figura 8 - Avaliação dos componentes inflamatórios. Avaliação das atividades das enzimas MPO (A) e NAG (B). Os valores de MPO e NAG foram maiores nos animais do grupo tratado com própolis em relação ao grupo controle. * $p < 0,05$.

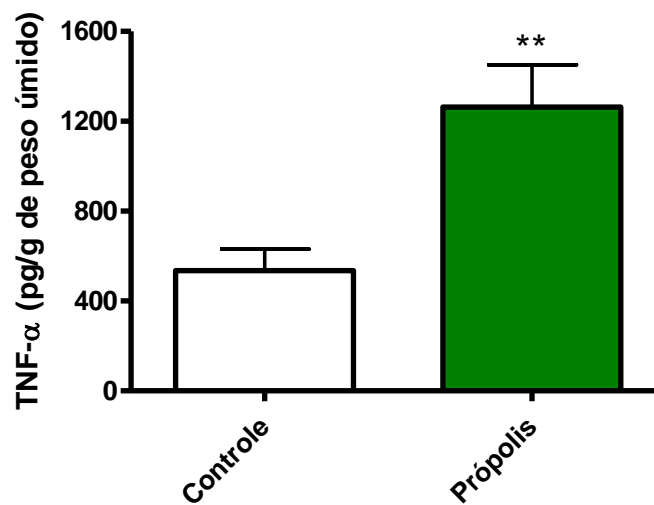


Figura 9 - Avaliação da produção de TNF- α . O tratamento com própolis aumentou a produção de TNF- α em 136%. ** $p < 0,01$

4.5 Perfil da expressão gênica dos macrófagos

Uma vez que a própolis modulou o recrutamento e ativação de macrófagos nos implantes, foi avaliada a expressão de genes associados com ativação e diferenciação de macrófagos. Dessa forma, observou-se que a expressão dos genes para NOS2 ou iNOS e IFN- γ associados com a ativação de macrófagos clássicos, bem como os marcadores FIZZ1 e YM1 associados com a ativação de macrófagos alternativos, estavam sendo mais expressos nos animais tratados com própolis em relação ao grupo controle (Figura 10).

A expressão de NOS2 aumentou 23,7 vezes nos animais tratados com própolis em relação ao controle, sugerindo uma predominância do perfil

clássico/inflamatório corroborado pelo aumento nos níveis de MPO, NAG e TNF- α (Figuras 8A-B e 9) e diminuição dos níveis de TGF- β 1 e colágeno (Figura 7A-B) contribuindo para a diminuição das aderências.

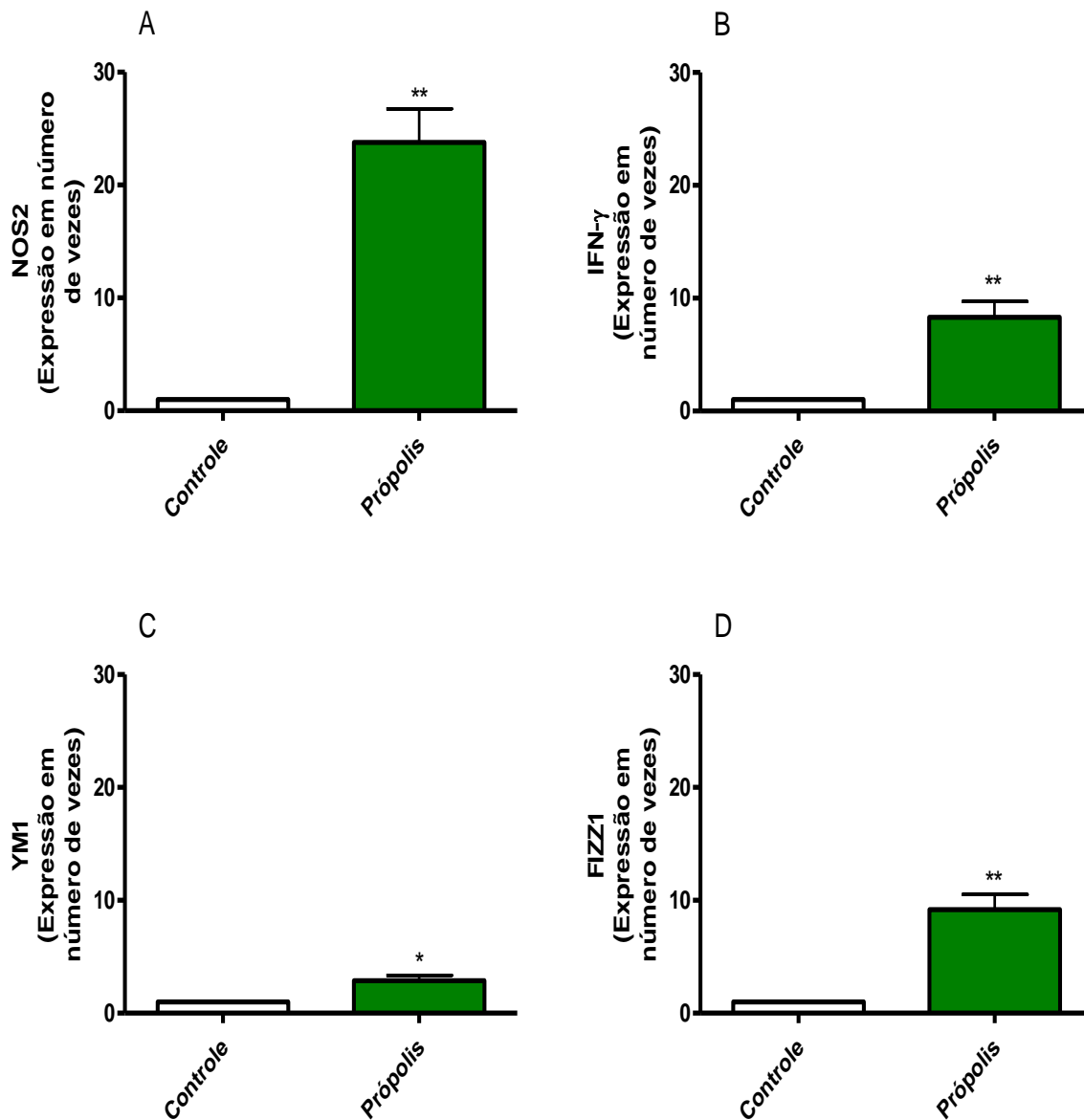


Figura 10—Expressão gênica para análise do perfil de macrófagos. A: Expressão dos genes para macrófagos classicamente ativados (NOS2 e IFN- γ); B: Expressão dos genes para macrófagos alternativamente ativados (FIZZ1 e YM1) (B). A própolis aumentou a expressão dos quatro genes analisados em relação ao grupo controle. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

4.6 Análise histológica

O tricrômico de Gomori é um corante utilizado para evidenciar fibras conjuntivas. Os cortes histológicos do implante de esponja mostraram a presença de células inflamatórias, fibroblastos e vasos sanguíneos. O tecido fibrovascular em implantes de camundongos não tratados era mais denso e mais vascularizado do que aquele desenvolvido nos implantes do grupo tratado com própolis (Figura 11).

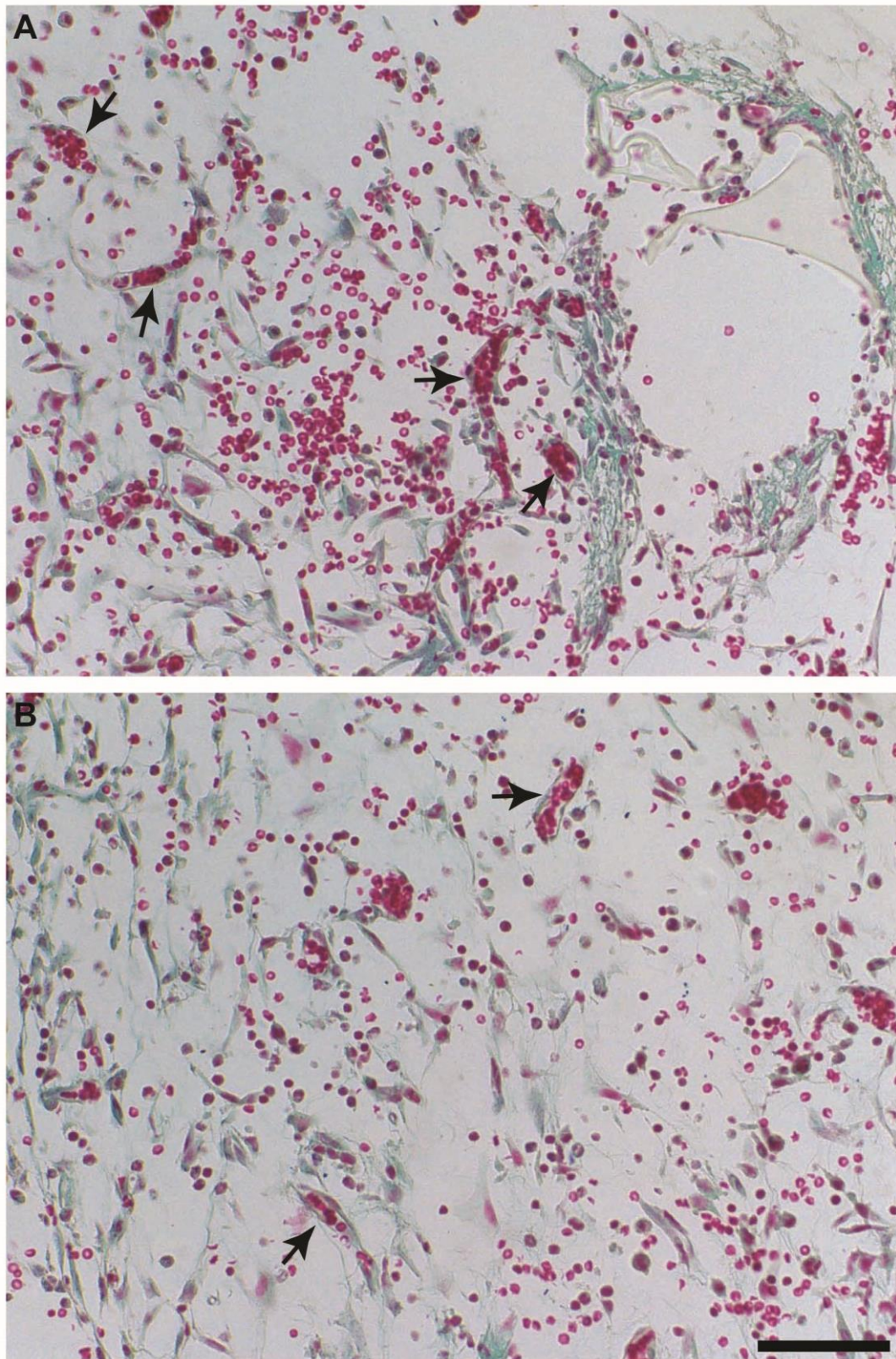


Figura 11 – Corte histológico do implante intraperitoneal de esponja corado pelo tricrômico de Gomori. O grupo tratado mostra menor deposição de tecido conjuntivo e vasos sanguíneos (B) em relação ao controle (A). Setas: vasos sanguíneos; aumento 60X; barra de 50 μ m.

5 DISCUSSÃO

A própolis é conhecida por seus efeitos anti-inflamatórios e tem sido utilizada na cicatrização de feridas incluindo úlceras e incisões na pele. Devido também a ações antimicrobianas, antifúngicas, a própolis tem sido utilizada na medicina popular por muitos séculos (Ghisalberti, 1979) e atualmente também está inserida no mercado de cosméticos como cremes faciais e loções (Burdock, 1998). Com o objetivo de evitar o cheiro etanólico característico e problemas de solubilidade, extratos aquosos da própolis (Matsuno, 1997) ou com outros solventes como glicerol são encontrados no mercado. Ainda não há uma padronização destes extratos e de seus componentes, uma vez que a sua composição pode variar em decorrência da região em que se encontra a colmeia, do clima, e da espécie de planta onde a resina é coletada. Os componentes primários do extrato aquoso da própolis verde coletada no município de Jaguaraçu, Minas Gerais, e utilizada no presente trabalho foram descritos por Moura e colaboradores (2011a), cujas substâncias encontradas em maiores concentrações foram os ácidos cafeoilquínicos e derivados do ácido cinâmico, como a artepelina C. Estes autores também avaliaram o efeito deste extrato em um modelo de inflamação crônica em camundongos, porém o estudo do uso da própolis sobre aderências peritoneais ainda não tinha sido investigado.

As aderências são caracterizadas por aumento do estroma conjuntivo, abundante infiltrado inflamatório, densamente vascularizadas, e são decorrentes de cicatrização anormal ou exacerbadas, ou por um processo reacional em que a produção da matriz extracelular não está relacionada com o processo reparativo (Herrick, *et al*, 2000). Estudos pioneiros sugeriram que as aderências

funcionavam como pontes vasculares entre órgãos saudáveis e áreas com tecidos isquêmicos (Ellis, 1962). Mais recentemente, estudos morfofuncionais têm revelado vários componentes bioquímicos, histológicos e moleculares destes tecidos. Células mesoteliais peritoneais que delimitam a superfície serosa da cavidade peritoneal fornecem uma barreira natural e protetora que previne os órgãos de aderirem a superfícies serosas opostas e/ou adjacentes. Entretanto, a lesão celular e tecidual causada por procedimentos cirúrgicos, infecção ou inflamação compromete a integridade das células mesoteliais, resultando em uma resposta biológica local com a intenção de reparar o dano à superfície. Se a lesão é relativamente extensa, levando à migração excessiva de fibroblastos, iniciará uma cascata de eventos, culminando no desenvolvimento de aderência peritoneal (Ellis *et al*, 1999; Ginsburg and Diamond, 1997; Lower *et al*, 2000). A formação de aderências, como todo processo de cicatrização, é dependente de angiogênese, cujos principais estímulos são a isquemia, processos inflamatórios, fatores de crescimento, citocinas como VEGF e TNF- α , quimiocinas e tecidos que estão em proliferação.

Historicamente, há uma grande dificuldade em avaliar e comparar a literatura sobre aderência, uma vez que existe extensa variabilidade de resultados de diferentes modelos animais e entre diferentes maneiras de induzir uma lesão peritoneal. Recentemente, foi demonstrado que a implantação de matrizes sintéticas de poliéster-poliuretano na cavidade peritoneal de camundongos induzia a formação de aderências cujos componentes inflamatórios, angiogênico e fibrogênico foram caracterizados (Mendes *et al* 2007).

O efeito do extrato aquoso da própolis verde em parâmetros inflamatórios, vasculares e fibrogênicos no modelo de aderências intraperitoneais induzidas por implantes de esponja foi avaliado pela primeira vez neste trabalho.

A utilização de própolis por seres humanos a administração em camundongos não mostrou efeitos secundários (Kaneeda & Nishina, 1994; Sforcin *et al*, 1995, 2002; Jasprica *et al*, 2007). De acordo com Burdock (1998), a própolis não apresenta toxicidade e após o tratamento com diversas doses (1, 3 e 6 g/kg/dia), diferentes extratos (aquoso ou etanólico) e em tempos variados (30, 90 e 150 dias) não foram observadas nos animais alterações significativas em lipídios totais, triglicérides e colesterol (Mani *et al*, 2006). Cuesta e colaboradores (2005) também não observaram mortalidade ou alterações na taxa de crescimento após ingestão diária da própolis durante seis semanas. Do mesmo modo, durante os cinco dias de experimento, os animais tratados com própolis verde também não apresentaram qualquer sinal de estresse, infecção ou desconforto.

A primeira abordagem experimental utilizada neste estudo foi avaliar eventos inflamatórios iniciais na cavidade peritoneal induzidos pela implantação da matriz sintética pelo método de difusão da fluoresceína. Os resultados desta avaliação mostraram que a vasodilatação e/ou a permeabilidade vascular na cavidade peritoneal estavam aumentados 24 horas após a cirurgia, uma vez que a fluoresceína levou um tempo menor para alcançar seu pico máximo de intensidade na circulação sistêmica nos animais implantados em relação àqueles não-implantados (basal). Essa alteração vascular pode ter ocorrido devido à reação inflamatória local em decorrência do processo cirúrgico para colocação do implante ou mesmo devido à presença do implante. Os animais tratados com

própolis por 4 dias apresentaram o pico da difusão semelhante ao nível basal dos animais não-implantados (aproximadamente 20 minutos). Estes resultados sugerem uma ação da própolis diminuindo a angiogênese como observado nos resultados do conteúdo de hemoglobina, e/ou no controle da vasodilatação e da permeabilidade vascular.

O processo angiogênico é importante em muitos processos fisiológicos e também em processos reparativos incluindo cicatrização de feridas, fraturas e regeneração do fígado. A angiogênese patológica ocorre mais comumente em isquemia, doenças inflamatórias e neoplasias. Em doenças isquêmicas do coração, por exemplo, no infarto do miocárdio, há o desenvolvimento de uma nova rede de vasos sanguíneos, melhorando a função do órgão isquêmico (Carmeliet & Jain, 2000).

Efeitos anti-angiogênicos da própolis já foram observados em experimentos na córnea de coelhos lesada por cauterização com nitrato de prata, em experimentos com membrana cório-alantóide de embrião de galinha e também no modelo subcutâneo de implantes de esponja em camundongos (Song et al., 2002; Ahn et al, 2007; Moura et al 2011b). Portanto, o controle da angiogênese, evidenciado pela diminuição do conteúdo de hemoglobina e visivelmente mostrado na histologia dos implantes de esponja, sugere um ponto importante na prevenção das aderências abdominais pela própolis.

O VEGF, anteriormente conhecido como VPR (fator de permeabilidade), foi primeiramente descrito por Senger e colaboradores em 1983. É uma importante citocina envolvida na angiogênese, sendo produzida por células endoteliais, fibroblastos, células musculares lisas e pela maioria das células inflamatórias (macrófagos, linfócitos, neutrófilos e eosinófilos) (Ferrara, 2000).

Em artropatias, a angiogênese está diretamente relacionada com o aumento de VEGF, assim como em mulheres com endometriose, nas quais a angiogênese é responsável pela progressão da doença, o fluido peritoneal também apresenta níveis elevados dessa citocina (Jóska *et al*, 2000).

Trabalhos utilizando fármacos anti-inflamatórios mostram uma correlação direta entre diminuição dos níveis de VEGF e redução da angiogênese. Entretanto, a relação inversa observada pelo aumento dos níveis deste fator de crescimento no grupo tratado com própolis pode ser explicada por uma possível hipóxia gerada pela diminuição dos vasos sanguíneos e consequentemente diminuição do aporte de oxigênio no implante, o que estaria estimulando a produção de VEGF para compensar o suprimento sanguíneo deficiente. A hipóxia exerce um efeito significativo na produção de VEGF também em doenças pulmonares, cujos experimentos em animais revelaram que a hipóxia crônica ou aguda, aumenta a secreção de VEGF e o número de seus receptores nos tecidos pulmonares (Christou *et al*, 1998). O mesmo efeito é observado no miocárdio 24 horas após a hipóxia (Gu & Adair, 1997), sustentando o fato de que na ausência de hipóxia e/ou estresse oxidativo, os níveis de VEGF estão diminuídos (Ikeda *et al*, 1995; Ferrara, 1999).

A deposição descontrolada e exacerbada de colágeno é uma das características histopatológicas mais marcantes das aderências, em cuja patogênese os fibroblastos têm um papel crucial. Estas células também estão envolvidas na formação da neointima e remodelamento da adventícia após lesão vascular (Li *et al*, 2000). Tradicionalmente, os fibroblastos são vistos como células produtoras de proteínas da matriz extracelular, como colágeno e fibronectina, mas também podem modificar a qualidade, quantidade e duração

do infiltrado inflamatório durante a inflamação (Parsonage *et al*, 2005; Baglole *et al.*, 2006; Flavell *et al.*, 2008). Quando ativados, podem produzir citocinas, fatores de crescimento e proteases em condições fisiológicas e patológicas como no remodelamento, na fibrose e no câncer (Smith *et al*, 1997; Orimo & Weinberg, 2006).

A análise da deposição de colágeno avaliada pelo método bioquímico do *picrossirius red* mostrou que nos implantes dos animais tratados com própolis houve uma diminuição deste componente em relação ao grupo controle e, paralelamente, foi observado uma redução nos níveis da citocina pró-fibrogênica TGF- β 1 nos implantes tratados.

A expressão aumentada de TGF- β 1 está relacionada com processos patológicos envolvendo a fibrose em vários locais ao longo do corpo, tais como fibrose pulmonar, glomerulonefrite, cirrose no fígado e quelóide na pele (Border & Noble, 1994; Roberts, 1995). Estudos mostraram que a administração intraperitoneal de TGF- β 1, pós-operatório, aumentou a incidência na formação de aderências (Williams *et al*, 1992), enquanto a administração de anticorpos contra esta citocina reduziu a formação desta patologia (Lucas *et al.*, 1996).

Uma vez que a deposição excessiva de colágeno é uma característica marcante do processo fibrótico e o TGF- β 1 é um fator chave na modulação da fibrose tecidual, incluindo aderência peritoneal, o tratamento com própolis mostra o efeito anti-fibrogênico no modelo de implante intraperitoneal de esponja. Moura e colaboradores (2011b) também observaram o mesmo efeito da própolis verde em um modelo de angiogênese inflamatória de implantes subcutâneos de matrizes sintéticas em camundongos. A análise histológica pelo tricrômico de

Gomori mostra redução da área de fibrose e corrobora com a diminuição de colágeno mostrado pelo picro sirius no grupo tratado.

A diminuição do peso dos implantes dos animais tratados com própolis pode estar relacionada com as diminuições da angiogênese e da deposição de colágeno observados nesse grupo.

Os parâmetros inflamatórios analisados (atividade de MPO, atividade de NAG e produção de TNF- α) apresentaram-se elevados após o tratamento com a própolis. A ativação de células inflamatórias representa um mecanismo de defesa e neste sentido (melhor falar sobre M2) é possível especular que o aumento das atividades das enzimas MPO e NAG seja um dos mecanismos de controle das aderências pela própolis. Ar'Rajab e colaboradores (1995) observaram que um aumento no número de macrófagos peritoneais diminuía o grau de formação de aderências pós operatórias em um modelo cirúrgico de coelhos. Em estudos mais recentes, foi demonstrado que a depleção de macrófagos em um modelo de camundongos transgênicos permitiu o desenvolvimento de aderências em 80% dos animais (Burnett *et al*, 2004). Foi observado por Leibovich & Ross em 1975, que em camundongos com macrófagos não ativados houve um retardo no reparo de feridas. Fukasawa e colaboradores (1989) demonstraram que macrófagos ativados pós-cirúrgicamente apresentavam frequentemente uma redução da atividade fibrinolítica, o que contribuiu para a persistência de aderências. Por outro lado o aumento da atividade de macrófagos observado em nosso modelo após o tratamento com a própolis, parece ser um fator benéfico de controle da deposição de matriz extracelular por modular a expressão de TGF- β , através de um contrabalanço com a produção aumentada de TNF- α .

Este balanço também pôde ser observado ao examinar o perfil dos macrófagos ativados, presentes no microambiente da esponja, através da expressão gênica de marcadores característicos. As citocinas derivadas dos macrófagos são cruciais para a coordenação de respostas inflamatórias apropriadas (Gordon & Taylor, 2005). Macrófagos ativados com citocinas Th1 polarizam para o fenótipo pró-inflamatório M1, levando a uma superexpressão de citocinas e quimiocinas como TNF- α , CCL-2, IL-12, IL-6 e IFN- γ e aumentam a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e intermediários de nitrogênio. Em contrapartida, a ativação de uma resposta Th2, direciona para um perfil anti-inflamatório de macrófagos M2, o que leva a uma expressão aumentada dos receptores de manose e galactose, e de arginase-1, FIZZ1 e YM1 (Gordon, 2003; Martinez *et al*, 2009).

Os fenótipos de macrófagos influenciam o processo cicatricial por diferentes caminhos, de acordo com o microambiente no qual irão exercer sua função. Ambos os tipos são necessários na resolução da lesão, de modo que a prevalência ora de um, ora de outro fenótipo é crucial nas diferentes fases da cicatrização de feridas, podendo isso também ser estendido para a formação das aderências. Na fase pró-inflamatória do processo, macrófagos M1 são necessários para a remoção de resíduos extracelulares e neutralizar possíveis patógenos invasores. Por outro lado, em uma fase na qual ocorre o reparo, macrófagos M2 tem um papel mais importante (Delavary *et al*, 2011). Em um processo de formação de aderências, o balanço entre ambos os fenótipos parece tender para o predomínio do perfil M2, como nos processos de fibrose (Duffield 2003). Neste sentido é possível supor que a própolis influencia a predominância do fenótipo M1 dos macrófagos, uma vez que houve um aumento substancial na

expressão de genes relacionados a ativação clássica de macrófagos (iNOS e IFN- γ). Este perfil contribui para o controle da formação das aderências sem, porém, criar uma condição inflamatória prejudicial para o organismo.

O papel dos macrófagos na fibrose e em cicatrizações de feridas tem sido destacado em muitos estudos (Duffield 2003) porém, o efeito da própolis influenciando no perfil de ativação de macrófagos ainda não havia sido estudado, e tais achados podem representar um passo importante sobre mecanismos de controle das aderências bem como de outras patologias associadas à fibrose.

A formação de aderências intraperitoneais após cirurgias abdominais é uma área que tem recebido uma atenção crescente. Métodos atuais de prevenção focam no uso de barreiras (Alponat *et al*, 1997; Bulbulla *et al*, 2003) e no cuidado das técnicas cirúrgicas (Holmdahl *et al.*, 1997), porém estes métodos reduzem a incidência de aderências pós operatórias, mas não as eliminam. A profilaxia das aderências é um alvo terapêutico almejado, uma vez que a janela de tempo para intervenção eficaz é pequena, de 5 a 7 dias, o que inviabiliza a utilização de tratamentos longos e contínuos. Um tratamento eficaz de curta duração para a prevenção dessa patologia minimizaria a preocupação sobre efeitos colaterais da utilização de biomateriais e drogas bem como das terapêuticas de longo prazo. Técnicas preventivas mais eficazes provavelmente irão evoluir a partir de um entendimento dos mecanismos moleculares e celulares que induzem e regulam a formação de aderências. Os resultados obtidos neste trabalho mostram que o extrato aquoso da própolis verde talvez possa ser um candidato à prevenção de aderências por modular os componentes inflamatórios, angiogênico e fibrogênico nessa patologia.

A própolis é um produto natural, característica essa cada vez mais valorizada pelas indústrias farmacêuticas e pela Organização Mundial de Saúde, e possui efeitos sobre processos patológicos onde inflamação, angiogênese e fibrogênese coexistem, modulando esses eventos, muito embora estudos mais aprofundados ainda sejam necessários.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Agocha, A., Lee H.W., Eghbali–Webb M. (1997). Hypoxia regulates basal and induced DNA synthesis and collagen type I production in human cardiac fibroblast: effects of transforming growth factor – β 1, thyroid hormone, angiotensin II and basic fibroblast growth factor. *J Mol Cell Cardiology*, 29: 2233 – 2244.
2. Ahn, M.R., Kunimasa, K., Yanagihara, M., *et al.* (2007). Suppression of tumor-induced angiogenesis by Brazilian propolis: major component artepillin C inhibits in vitro tube formation and endothelial cell proliferation. *Cancer Lett*, 252 (2), 235-43.
3. Alpay Z., Saed G.M., Diamond M.P. (2008). Postoperative adhesions: from formation to prevention. *Semin Reprod*, 26: 313-321
4. Alponat, A., Lakshminarasappa, S., Teh, M., *et al.* (1997). Effects of Physical Barriers in Prevention of Adhesions: An Incisional Hernia Model in Rats 1 Background: Adhesion formation between viscera. *J Surg Res*, 132 (68), 126-132.
5. Amaral, A.S., Gaspar, L.F.J., Bassani-Silva, S., *et al.* 2005. Cytological diagnostic of transmissible venereal tumor in the Botucatu region, Brazil (descriptive study: 1994–2003). *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 99:167–171

6. Andrade S.P., Fan T.P-D, Lewis G.P. (1987). Quantitative in vivo studies on angiogenesis in a rat sponge model. *Br J Exp Path*, 68:755–766.
7. Baglole, C.J., Ray, D.M., Bernstein, *et al.* (2006) More than structural cells, fibroblasts create and orchestrate the tumor microenvironment. *Immunological investigations*, 35 (3-4):297-325.
8. Bailey, P.J. (1988). Sponge implants as models. *Methods Enzymol*, 162:327-34.
9. Bankova, V. (2005). Recent trends and important developments in propolis research. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2 (1), 29–32.
10. Banskota, A. H., Tezuka Y., Kadota S., *et al* (2001). Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytother Res*, 15 (7), 561-571.
11. Barcelos, L.S., Talvani A., Teixeira A.S., *et al.* (2004). Production and in vivo effects of chemokines CXCL1-3/KC and CCL2/JE in a model of inflammatory angiogenesis in mice. *Inflamm Res*, 53:576–584
12. Beelen, R.H.J. (1991). The Greater omentum: physiology and immunological concepts. *Neth J Surg*. 43: 145 -149.
13. Belo, A.V., Leles, F., Barcelos, L.S., *et al.* (2005). Murine chemokine CXCL2/KC is a surrogate marker for angiogenic

activity in the inflammatory granulation tissue. *Microcirculation*, 12:597–606.

14. Benelli, R., Morini, M., Carrozzino, F., *et al.* (2002) Neurotrophils as a key cellular target for angiostatin: implications for regulation of angiogenesis and inflammation. *FASEB J*, 16(2): 267 – 269.
15. Bittinger F., Brochhausen C., Kohler H., *et al.* (1998) Differential expression of cell adhesion molecules in inflamed appendix: Correlation with clinical stage. *J Pathol*, 186:422–428.
16. Bittinger F., Klein C.L., Skarke C., *et al.* (1997) A three-dimensional cell culture method for studying peritoneal adhesions. In: Treutner K-H, Schumpelick V, editors. *Peritoneal Adhesions*. Berlin Heidelberg: Springer Verlag, 49–63.
17. Blobel, GC; Schiemann, WP; Lodish, HF. (2000). Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Engl J Med*, 342 (18): 1350 – 1358.
18. Border, W.A., & Noble, N.A. (1994). Transforming growth factor β in tissue fibrosis. *New Engle J Med*, 331, 1286 – 12000.
19. Bourdel, N., Matsuzaki, S., Bazin, J.E., *et al.* (2007). Peritoneal tissue-oxygen tension during a carbon dioxide pneumoperitoneum in a mouse laparoscopic model with controlled respiratory support. *Hum Reprod*, 22:1149-1155
20. Bradshaw, A.D., Reed, M.J. *et al.* (2010). Increased fibrovascular invasion of subcutaneous polyvinyl alcohol

- sponges in SPARC-null mice. *Wound Repair Regen*, 9(6):522-30.
21. Buckman, R.F., Woods, M., Sargent, L., *et al.* (1976). A unifying pathogenetic mechanism in the etiology of intraperitoneal adhesions. *J Surg Res*,. 20:1–5.
 22. Bulbulla, N., Sapmaz, E., Akpolat, N., *et al.* (2003) Effect of bioresorbable membrane on postoperative adhesions and wound healing. *J Reprod Med*, 48(7):547-50.
 23. Burdock, G.A. (1998). Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 36(4), 347-63.
 24. Burnett, S.H.,Kershen, E.J., Zhang, J., *et al.* (2004). Conditional macrophage ablation in transgenic mice expressing a Fas-based suicide gene. *J LeukocBiol*, 75(4):612-23.
 25. Campos, P.P., Andrade, S.P., Moro, L., *et al.* (2006). Cellular proliferation, differentiation and apoptosis in polyether-polyurethane sponge implant model in mice. *Histol Histopathol*, 21(12):1263-70.
 26. Carmeliet, P., & Jain, R.K. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, 407 (6801): 249-57.
 27. Carter D., Truel, Otis C.N. (1997) Serous Membranes. *Histology for Pathologists*. SS Stenberger. New York: **Lippincott-Raven**. 2299 – 2328.

28. Chegini N. (1997) The role of growth factors in peritoneal healing: transforming growth factor beta (TGF-beta). **Eur J Surg Suppl**; 17-23
29. Chegini, N., Kotseos, K., Zhao, Y., *et al.* (2001) Differential expression of TGF-beta1 and TGF-beta3 in serosal tissues of human intraperitoneal organs and peritoneal adhesions. **Hum Reprod**; 16: 1291-1300
30. Chegini, N. (2002) Peritoneal molecular environment, adhesion formation and clinical implication. **Front Biosci.** 7: 91 – 115.
31. Cheong, Y.C., Shelton, J.B., Laird, S.M., *et al.*(2003). Peritoneal fluid concentrations of matrix metalloproteinase-9, tissue inhibitor of metalloproteinase-1, and transforming growth factor-beta in women with pelvic adhesions. **FertilSteril**, 79: 1168-1175
32. Cheong, Y.C., Laird, S.M., Li, T.C., *et al* (2001). Peritoneal healing and adhesion formation/reformation. **Human Reproduction Update**, 7:556-566.
33. Chipperfield, H., Kuldip, S.B., Simon, M.C., *et al.* (2002) Heparan sulfates isolated from adult neural progenitor cells can direct phenotypic maturation. **Int J Dev Biol**, 46: 661 – 670.
34. Christou, H., Yoshida, A., Arthur, V., Morita, T., Kourembanas, S. (1998). Increased vascular endothelial growth factor production in the lungs of rats with hypoxia-induced pulmonary hypertension. **Am J Respir Cell MolBiol**, 18(6):768-76.

35. Clark, R.A. (2001). Fibrin and wound healing. **Ann N Y AcadSci**, 936:355-67.
36. Clark, R.A.F. (1996). Chap. 4: Wound repair. The molecular and cellular biology of wound repair. 2ndedn. **New York: Plenum press**. 143 – 168.
37. Coleman, M.G., McLain, A.D., Moran, B.J. (2000). Impact of previous surgery on time taken for incision and division of adhesions during laparotomy. **Dis Colon Rectum**, 43:1297–1299.
38. Crowther, M., Brown, N.J., Bishop, E.T., *et al.* (2001). Microenvironmental influence on macrophage regulation of angiogenesis in wound and malignant tumors. **J Leukoc Biol**, 70(4): 478 – 90.
39. Cuesta, A., Rodríguez, A., Esteban, M.A., *et al.* (2005). In vivo effects of propolis, a honeybee product, on gilthead seabream innate immune responses. **Fish & Shelfish Immunology**, 18, 71–80
40. Cunha, I.B.S., Sawaya, A.C.H.F., Caetano, F.M., *et al.* (2004). Factors that influence the yield and composition of Brazilian propolis extracts. **J BrazChemSoc**, 15, 964–970.
41. Delavary B.M., van der Veer W.M., van Egmond M. *et al.* (2011). Macrophages in skin injury and repair. **Immunobiol**, 216:753-762.

42. Diamond, M.P., El-Hammady E., Munkarah, A., *et al.* (2005) Modulation of the expression of vascular endothelial growth factor in human fibroblasts. **Fertil Steril**, 83:405–409.
43. Diamond, M.P., Wexner, S.D., diZerega, G.S., *et al.*(2010). Adhesion prevention and reduction: current status and future recommendations of a multinational interdisciplinary consensus conference. **SurgInnov**, 17: 183-188.
44. Diegelmann, R.F., Cohen, I.K., Kaplan, A.M. (1981). The role of macrophages in wound repair: a review. **Plast Reconstr Surg**, 68(1):107-13
45. Dimov, V., Ivanovska, N., Manolova, N., *et al.* (1991). Immunomodulatory action of propolis. Influence on anti-infections protection and macrophage function. **Apidologie**, 22:155–162
46. diZerega, G.S., Campeau, J.D. (2001). Peritoneal repair and post-surgical adhesion formation. **Hum Reprod Update**, 7:547–555.
47. diZerega, G.S. (2000). Use of Adhesion Barriers in Pelvic Reconstructive and Gynecologic Surgery. **NewYork: Springer Verlag**. p 379–99.
48. Drabkin, D.L. Austin, J.H. (1932). Spectrophotometric constants common hemoglobina derivatives in human, dog and rabbit blood. **J. Biol. Chem**, 98:719-733.

49. Duffield, J.S. (2003). The inflammatory macrophage: a story of Jekyll and Hyde. **Clin Sci (Lond)**, 104(1):27-38.
50. Ellis, H. (1962). Post-operative intra-abdominal adhesions. **Nature**, 12 (194):580-1.
51. Ellis, H. (1997) The clinical significance of adhesions: focus on intestinal obstruction. **Eur J Surg Suppl.** 577: 5 – 9.
52. Ellis, H., Moran, B. J., Thompson, J. N., *et al.* (1999). Adhesion-related hospital readmissions after abdominal and pelvic surgery: a retrospective cohort study. **Lancet**, 353(9163), 1476-80.
53. Eming, S.A, Krieg, T., Davidson, J.M. (2007). Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. **J Invest Dermatol**, 127, 514 – 525.
54. Epstein, J.C., Wilson, M.S., Wilkosz, S., *et al.* (2006). Human peritoneal adhesions show evidence of tissue remodeling and markers of angiogenesis. **Dis Colon Rectum**, 49: 1885-1892
55. Fachinger, G., Deutsch, U., Risau, W. (1999) Functional interaction of vascular endothelial – protein – tyrosine phosphatase with the angiopoietin receptor Tie – 2. **Oncogene**, 18(43): 5948 – 5953.
56. Falcão, S.I., Vilas-Boas, M., Estevinho, L.M., *et al.* (2010). Phenolic characterization of Northeast Portuguese propolis: usual and unusual compounds. **Analyt Bioanalyt Chem**, 396, 887–897.

57. Ferrara N. (1999). Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. **J Mol Med**, 77: 527 – 43.
58. Ferrara N. (2000). Vascular endothelial growth factor and the regulation of angiogenesis. **Prog Horm Res**, 55:15-35.
59. Ferreira, M.A.N.D., Barcelos, L.S., Campos, P.P., *et al* (2004). Sponge-induced angiogenesis and inflammation in PAF receptor deficient mice (PAFR-KO). **Br J Pharmacol**, 141:1185–1192.
60. Flavell, S.J., Hou, T.Z., Lax, S., *et al.* (2008). Fibroblasts as novel therapeutic targets in chronic inflammation. **Br J Pharmacol**, 153 (Suppl. 1): S241–6.
61. Fukasawa, M., Campeau, J.D., Girgis, W., *et al.* (1989) Production of protease inhibitors by postsurgical macrophages. **J Surg Res**, 46(3):256-61
62. Gerber, H.P., Condorelli, F., Park J., *et al.* (1997). Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. Flt-1, but not Flk-1/KDR, is upregulated by hypoxia. **J Biol Chem**, 272(38):23659-67.
63. Ghellai, A.M., Stucchi, A.F., Chegini, N., *et al.*(2000). Role of transforming growth factor beta-1 in peritonitis-induced adhesions. **J Gastrointest Surg**, 4: 316-323
64. Ghisalberti, E.L. (1979). Propolis: a review. **Bee World**, 60:59-84.

65. Ginsburg, K.A. & Diamond, M.P. (1997). Adhesion development after endometriosis surgery. *Endometrium and endometriosis*. **Blackwell Science, Malden**, 235–246.
66. Gómez-Caravaca, A.M., Gómez-Romero, M., Arráez-Román, D., *et al.* (2006). Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. **J Pharm Biomed Anal**, 41, 1220–1234.
67. Gordon S., & Taylor P.R. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. **Nat Rev Immunol**, 5:953–964.
68. Gordon S. (2003) Alternative Activation of macrophages. **Nat Rev Immunol**, 3: 23 – 35.
69. Gorvy, D.A., Herrick, S.E., Shah, M., *et al.* (2005). Experimental manipulation of transforming growth factor-beta isoforms significantly affects adhesion formation in a murine surgical model. **Am J Pathol**, 167: 1005-1019
70. Grindlay, J.H., Waugh, J.M. (1951). Plastic sponge which acts as a framework for living tissue. **Arch Surg**, 63:288 -297.
71. Gu, J.W. & Adair, T.H. (1997). Hypoxia-induced expression of VEGF is reversible in myocardial vascular smooth muscle cells. **Am J Physiol**, 273:H628–H633.
72. Hall, M.C., Young, D.A., Waters, J.G., (2003) The comparative role of activator protein 1 and Smad factors in the regulation of Timp-1 and MMP-1 gene expression by transforming growth factor-beta 1. **J Biol Chem**, 278(12):10304-13.

73. Haney, A.F. (2000). Identification of macrophages at the site of peritoneal injury: evidence supporting a direct role for peritoneal macrophages in healing injured peritoneum. **Fertil Steril**, 73: 988-995
74. Hellebrekers, B.W., Emeis, J.J., Kooistra, T., *et al.*(2005). A role for the fibrinolytic system in postsurgical adhesion formation. **Fertil Steril**, 83: 122–129.
75. Herrick, S.E., Mutsaers, S.E., Ozua, P. (2000). Human peritoneal adhesions are highly cellular, innervated, and vascularized. **J Pathol**, 192(1):67-72.
76. Holmdahl, L., Eriksson, E., Eriksson, B.I., *et al.* (1998). Depression of peritoneal fibrinolysis during operation is a local response to trauma. **Surgery**, 123:539–544.
77. Holmdahl, L., Kotseos, K., Bergström, M., *et al.* (2001). Overproduction of transforming growth factorbeta1 (TGF- β 1) is associated with adhesion formation and peritoneal fibrinolytic impairment. **Surgery**, 129:626-632
78. Holmdahl, L. Making and covering of surgical footprints. (1999) **Lancet**, 353:1456–1457.
79. Holmdahl, L. (1997). Mechanisms of adhesion development and effects on wound healing. **Eur J Surg Suppl**, (579):7-9.
80. Holmdahl, L. & Ivarsson, LM, (1999). The role of cytokines, coagulation and fibrinolysis in peritoneal tissue repair. **Eur J Surg**, 165: 1012 – 1019.

81. Holmdahl, L., Eriksson, E., Al-Jabreen, M., *et al.* (1996). Fibrinolysis in human peritoneum during operation. **Surgery**, 119: 701 – 705.
82. Hu, D.E., Hiley, C.R., Smither, R.L., *et al.* (1995). Correlation of ¹³³Xe Clearance, Blood Flow and Histology in the Rat Sponge Model for Angiogenesis. Further studies with angiogenic modifiers. **Lab Invest**, 72(5): 601 – 610.
83. Ikeda, E., Achen, M.G., *et al.* (1995). Hypoxia-induced transcriptional activation and increased mRNA stability of vascular endothelial growth factor in C6 glioma cells. **J BiolChem**, 270(34):19761-6.
84. Ivanovska, N.D., Dimov, V.B., Pavlova, S., *et al.* (1995). Immunomodulatory action of propolis. V. Anticomplementary activity of a water-soluble derivative. **J Ethnopharm** 47, 135–143.
85. Ivarsson, M.L., Holmdahl, L., Eriksson, E., *et al.* (1998) Expression and kinetics of fibrinolytic components en plasma and peritoneum during abdominal surgery. **Fibrinolysis Proteolysis**, 12: 61 – 67.
86. Jasprica, I., Mornar, A., Debeljak, Z., *et al.* (2007). *In vivo* study of propolis supplementation effects on antioxidative status and red blood cells. **J Ethnopharm**, 110, 548–554.

87. Joško, J., Gwóźdź, B., Jedrzejowska-Szypułka, H., *et al.* (2000). Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its effect on angiogenesis. **Med SciMonit**,6(5):1047-52.
88. Kaneeda, J., Nishina, T., (1994). Safetiness of propolis. Acute toxicity. Honeybee. **Science** 15, 29–33.
89. Kim, W.J., Gittes, G.K., Longaker, M.T. (1998). Signal transduction in wound pharmacology. **Arch Pharm Res**, 21(5):487-95.
90. Knighton, D.R., Hunt, T.K., Scheuenstuhl, H., *et al.* (1983). Oxygen tension regulates the expression of angiogenesis factor by macrophages. **Scien**, 221(4617):1283-5.
91. Kresch, A.J., Seifer, D.B., Saschs L.B., *et al.* (1984). Laparoscopy in 100 women with chronic pelvic pain. **Obstet Gynecol**, 64:672-674.
92. Kubes, P. (2002) The complexities of leukocyte recruitment. **Sem Immuno**, 14: 65 – 72.
93. Kuijper P.H., Gallardo Torres H.I., Lammers J.W., *et al.* (1997). Platelet and fibrin deposition at the damaged vessel wall: cooperative substrates for neutrophil adhesion under flow conditions. **Blood**, 8(1):166-75.
94. Kumar, V., Conran, R.S., Schoen, F.J. (2005). **Robbins-Patologia Estrutural e Funcional**, Editora Elsevier.
95. Lavan, F.B. & Hunt, T.K. (1990). Oxygen and wound healing. **ClinPlastSurg**, 17(3):463-72.

96. Leibovich, S.J., & Ross, R. (1975). The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum. **Am J Pathol**, 78(1):71-100.
97. Li, Y.Y, McTiernan, C.F., Feldman, A.M. (2000). Interplay of matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and their regulators in cardiac matrix remodeling. **Cardiovasc Res**, 46:214-224.
98. Liakakos, T., Thomakos, N., Fine, P.M., *et al*(2001). Peritoneal adhesions etiology, pathophysiology, and clinical significance. **Dig Surg**; 18: 260 – 73.
99. Lingen, M.W. (2001) Role of leukocytes and endothelial cells in the development of angiogenesis in inflammation and wound healing. **Arch Pathol Lab Med**, 125(1): 67 – 71.
100. Lower, A.M., Hawthorn, R.J., Ellis, H. *et al.* (2000). The impact of adhesions on hospital readmissions over ten years after 8849 open gynaecological operations: an assessment from the Surgical and Clinical Adhesions Research Study. **Brit. J. Gynecol**, 107, 855–862.
101. Lucas, P.A., Warejcka, D.J., Young, H.E., *et al.* (1996) Formation of abdominal adhesions is inhibited by antibodies to transforming growth factor- β 1. **J Surg Res**, 65:135–138.
102. Luijendijk, R.W.; Delange, D.C.D.; Wauters, C.C.A.P. *et al.* (1996) Foreign material in postoperative adhesions. **Ann Surg**, 223: 242 – 248.

103. Macfarlane, A.S., Schwacha, M.G., Eisenstein, T.K., (1999). In vivo blockage of nitric oxide with aminoguanidine inhibits immunosuppression induced by an attenuated strain of *Salmonella typhimurium*, potentiates *Salmonella* infections, and inhibits macrophage and polymorphonuclear leukocyte influx into the spleen. **Infect Immun**, 67, 891–898.
104. Mani, F., Damasceno, H.C.R., Novelli, E.L.B., *et al.* (2006). Propolis: effect of different concentrations, extracts and intake period on seric biochemical variables. **J Ethnopharm**, 105, 95–98.
105. Mantovani A, Sica A, Locati M (2007) New vistas on macrophage differentiation and activation. **Eur J Immunol**, 37:14–16
106. Marcucci, M.C. (1996). Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. **Química Nova**, v.19, p.529-535.
107. Martinez, F.O., Helming L., Gordon, S. (2009). Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. **Annu Rev Immunol**, 27:451–483.
108. Matsuno, T.; Jung, S-K; Matsumoto, Y; *et al.* (1997). Preferential cytotoxicity to tumor cells of 3,5-diprenyl-4-hydroxycinnamic acid (artepillin C) isolated from propolis. **Anticanc Res**, 17, (5A): 3565–3568.
109. Matsuzaki S., Canis M., Bazin, J.E., *et al.* (2007). Effects of supplemental perioperative oxygen on postoperative abdominal

- wound adhesions in a mouse laparotomy model with controlled respiratory support. **Hum Reprod**, 22: 2702-2706
110. McCourt, M., Wan, J.H., Sookhai, S., *et al.* (1999). Proinflammatory mediators stimulate neutrophil – directed angiogenesis. **Arch Surg**, 134(12):1325–1332.
111. Melichar, B. & Freedman, R.S. (2002). Immunology of the peritoneal cavity: Relevance for host – tumor relation. **Int J Gynecol Cancer**, 12(1): 3 – 17
112. Mendes, J.B., Campos, P.P., Ferreira, M.A., *et al.* (2007). Host response to sponge implants differs between subcutaneous and intraperitoneal sites in mice. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, 83(2): 408 – 415.
113. Mendes, J.B., Rocha, M.A., Araújo, F.A., *et al.* (2009). Differential effects of rolipram on chronic subcutaneous inflammatory angiogenesis and on peritoneal adhesion in mice. **Microvasc Res**, 78(3):265-71
114. Menzies, D., & Ellis, H. (1990). Intestinal obstruction from adhesions--how big is the problem? **Annals of the Royal College of Surgeons of England**, 72(1), 60-3.
115. Merlo, G., Fausone, G., Barbero, C., *et al.* (1980). Fibrinolytic activity of the human peritoneum. **EurSurg Res**, 12:433–438.
116. Mirzoeva, O.K. & Calder P.C. (1996). The effect of propolis and its components on eicosanoid production during the

- inflammatory response. Prostaglandins Leukot Essent. **Fatty Acids**, 55:441-9.
117. Miyataka, H., Nishiki, M., Matsumoto, H. *et al.* (1998). Evaluation of propolis (II): effects of Brazilian and Chinese propolis on histamine release from rat peritoneal mast cells induced by compound 48/80 and concanavalinA. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, 21: 723–729.
118. Mohammed, F.F., Smookler, D.S., Khokha, R. (2003) Metalloproteinases, inflammation, and rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis**, 2: 43 – 47.
119. Molinas, C.R., Campo, R., Dewerchin, M., *et al.* (2003). Role of vascular endothelial growth factor and placental growth factor in basal adhesion formation and in carbon dioxide pneumoperitoneum-enhanced adhesion formation after laparoscopic surgery in transgenic mice. **FertilSteril**, 80 Suppl2: 803-811
120. Molinas, C.R., Mynbaev, O., Pauwels, A., *et al.* (2001). Peritoneal mesothelial hypoxia during pneumoperitoneum is a cofactor in adhesion formation in a laparoscopic mouse model. **Fertil Steril**, 76: 560-567.
121. Molinas, C.R., Binda, M.M., Koninckx, P.R. (2006). Angiogenic factors in peritoneal adhesion formation. **Gynecol Sur.** 3(3): 157-67.

122. Moreira, L., Dias, L.G., Pereira, J.A., *et al.* (2008). Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of propolis samples from Portugal. **Food Chem Toxic**, 46: 3482–3485.
123. Moriyasu, J., Arai, S., Motoda, R., *et al.* (1994). In vitro activation of mouse macrophage by propolis extract powder. **Biotherapy**, 8:364– 365.
124. Mosser, D.M. & Edwards, J.P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nat Rev Immunol**, 8(12); 958-69.
125. Moura, S.A., Ferreira, M.A., Andrade, S.P., *et al.* (2011a). Brazilian green propolis inhibits inflammatory angiogenesis in a murine sponge model. **Evid Based Complement Alternat Med**, 2011:182703.
126. Moura, S.A., Negri, G., Salatino, A., *et al.* (2011b). Aqueous Extract of Brazilian Green Propolis: Primary Components, Evaluation of Inflammation and Wound Healing by Using Subcutaneous Implanted Sponges. **Evid Based Complement Alternat Med**, 2011: 748283.
127. Nakajima, Y., Shimazawa, M., *et al.* (2007). Water extract of propolis and its main constituents, caffeoylquinic acid derivatives, exert neuroprotective effects via antioxidant actions. **Life Sci**, 80, (4):370-7.
128. Nothenberg, M. (1997). Própolis enfrenta bem o desafio das pesquisas. **Química e Derivados**, 348:24-28.

129. Orimo A., & Weinberg, R.A. (2006). Stromal fibroblasts in cancer: a novel tumorpromoting cell type. **Cell Cycle**. 5: 1597–601.
130. Park, Y.P.I., Ikegaki, M., Abreu, J.A.D.S.; *et al.* (1998) Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 18(3).
131. Parsonage, G., Filer, A.D., Haworth, O., *et al.* (2005). A stromal address code defined by fibroblasts. **Trends Immunol**, 26: 150–156.
132. Passaniti, A., Taylor, R.M., Pili, R., *et al.* (1992). A simple, quantitative method for assessing angiogenesis and antiangiogenic agents using reconstituted basement membrane, heparin, and fibroblast growth factor. **Lab Invest**, 67(4): 519 – 528.
133. Phillips, R.J., Burdick, M.D.B., Hong, J., *et al.* (2004). Circulating fibrocytes traffic to the lungs in response to CXCL2 and mediate fibrosis. **Research Article**, 114(3): 319.
134. Plunkett, M.L. & Hailey, J.A. (1990). An in vivo quantitative angiogenesis model using tumor cells entrapped in alginate. **Lab Invest**, 62 (4), 510-517.
135. Podolsky, D.K. (2002). The current future understanding of inflammatory bowel disease. **Best Pract Res Clin Gastroenterol**, 16(6):933-43.

136. Quiroga, E.M., Sampietro, D.A., Soberón, J.R., *et al.* (2006). Própolis from the northwest of Argentina as a source of antifungal principles. **J Appl Microbiol**, 101, 103–110
137. Raftery, A.T. (1979). Regeneration of peritoneum: a fibrinolytic study. **J Anat**, 129: 659 – 664.
138. Ar´Rajab, A., Dawidson, I., Sentementes, J., *et al.* (1995). Enhancement of peritoneal macrophages reduces postoperative peritoneal adhesion formation. **J Surg Res**, 58(307-312).
139. Rajab, T., Ahmad, U., Kelly, E. (2010). Implications of late complications from adhesions for preoperative informed consent. **J R Soc Med**, 103:317–321.
140. Roberts, A.B. (1995). Transforming growth factor- β : activity and efficacy in animal models of wound healing. **Wound Rep Regen**, 3, 408 – 418.
141. Roberts, A.B. & Sporn MB. (1993). Physiological actions and clinical applications of transforming growth factor-beta (TGF-beta). **Growth Factors**, 8(1):1-9.
142. Robinson, S.C. (1962). Observations on the peritoneum as an absorbing surface. **Am J Obst Gynecol**, 83: 446 – 452.
143. Runyon, B.A. (1995). Surgical peritonites and other diseases of the peritoneum, mesentery, omentum, diafragma. **Gastroint Dis**, 2004 - 2014.
144. Saed, G.M., Diamond, M.P. (2003). Modulation of the expression of tissue plasminogen activator and its inhibitor by

hypoxia in human peritoneal and adhesion fibroblasts. **FertilSteril**, 79: 164-168

145. Saed, G.M., Galijasevic, S., Diamond, M.P., *et al.* (2005). Measurement of oxygen and nitric oxide levels in vitro and in vivo: relationship to postoperative adhesions. **Fertil Steril**, 84: 235-238.
146. Schnitzler, P., Neuner, A., Nolkemper, S., *et al.* (2010). Antiviral activity and mode of action of propolis extracts and selected compounds. **Phytother Res**, 24, S20–28.
147. Scott-Coombes, D., Whawell, S., Vipond, M.N., Thompson, J. *et al.* (1995). Human intraperitonealfibrinolytic response to elective surgery. **Br J Surg**, 82:414–417.
148. Segura, T., Schmokel, H., Hubbell, J.A. (2007). RNA interference targeting hypoxia inducible factor 1alpha reduces post-operative adhesions in rats. **J Surg Res**, 141: 162-170.
149. Sforcin, J.M., Funari, S.R.C., Novelli, E.L.B., (1995). Serum biochemical determinations of propolis-treated rats. **J Ven Anim Tox**, 1, 31–37.
150. Sforcin, J.M., Novelli, E.L.B., Funari, S.R.C., (2002). Seasonal effect of Brazilian propolis on seric biochemical variables. **J Ven Anim Tox**, 8, 244–254.
151. Siegler, A.M.; Kontopoulos, V., Wang, C.F. (1980). Prevention of postoperative adhesions in rabbits with ibuprofen, a nonsteroidal anti-inflammatory agent. **Fertil Steril**, 34(1):46-9

152. Silveira, I.S. & Raiser, A.G. (1995). Controle microbiológico dos efeitos in vivo de duas apresentações da própolis em feridas contaminadas de cães. **Veterinária Notícias**, 1(1): 11-17.
153. Singer, A.J., & Clark, R.A. (1999). Cutaneous wound healing. **N Engl J Med**, 10(341):738-46.
154. Smith, R.S., Smith, T.J., Blieden, T.M., *et al.* (1997). Fibroblasts as sentinel cells. Synthesis of chemokines and regulation of inflammation. **Am J Pathol**, 151: 317–22.
155. Solimene, A.C.C., Boscardini, S.B., Ferraz, M.G.C., *et al.* (1999) Angiogenesis in solid tumors. **SBOC**, 1: 9 – 20.
156. Song, Y.S.; Park, E.H.; Jung K.J., *et al.* (2002). Inhibition of angiogenesis by propolis. **Arch Pharm Res**, 25(4):500-4.
157. Stout, A.L., Steege, J.F., Dodson, W.C., *et al.* (1991). Relationship of laparoscopic findings to self-report of pelvic pain. **Am J Obstet Gynecol**, 164:73-79.
158. Tatefuji, T., Izumi, N., Ohta, T., *et al.*(1996). Isolation and identification of compounds from Brazilian propolis which enhance macrophage spreading and mobility. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, 19, 966–970
159. Teixeira, A.S.; Caliari, M.V.; *et al.* (1999). Aminoguanidine prevents impaired healing and deficient angiogenesis in diabetic rats. **Inflammation**, 23(6):569-81.
160. Thaler, K., Mack, J.A., Berho, M., *et al.*(2005). Coincidence of connective tissue growth factor expression with fibrosis and

angiogenesis in postoperative peritoneal adhesion formation. **EurSurgRes**, 37:235–241.

161. Thors, F., & Drukker, J. (1997) Serous membranes and their development, structure, and topography. In: Treutner K-H, Schumpelick V, editors. *Peritoneal Adhesions*. Berlin Heidelberg: Springer Verlag; 3–13.
162. Topley, N. (1995.) The cytokine network controlling peritoneal inflammation. **Perit Deal Int**, 15: 35 – 40.
163. Trimpos, J.B., Trimpos-Kemper G.C., Peters, A.A., *et al.* (1990) Findings in 200 consecutive asymptomatic women having a laparoscopic sterilization. **Arch Gynecol Obstet**, 247:121-124.
164. Umthong, S., Phuwapraisirisan, P., Puthong, S., *et al.* (2011). In vitro antiproliferative activity of partially purified Trigonalaevicepspropolis from Thailand on human cancer cell lines. **BMC Complement Altern Med**, 11, 30–37.
165. Valente, M.J., Baltazar, A.F., Henrique, R., *et al.* 2011. Biological activities of Portuguese propolis: protection against free radical-induced erythrocyte damage and inhibition of human renal cancer cell growth in vitro. **Food Chem Toxic**, 49, 86–92.
166. Van Der Krabben, A.A., Dijkstra, F.R., Nieuwenhuijzen M, *et al.* (2000). Morbidity and mortality of inadvertent enterotomy during adhesiotomy. **Br J Surg**, 87: 467–471.
167. VanHinsbergh, V.W., Kooistra, T., Scheffer, M.A., *et al.* (1990). Characterization and fibrinolytic properties of human omental

- tissue mesothelial cells. Comparison with endothelial cells. **Blood**, 75:1490–1497.
168. Velazquez, C., Navarro, M., Acosta, A., *et al.* (2007). Antibacterial and free-radical scavenging activities of Sonoran propolis. **Appl Microbiol**, 103, 1747–1756
169. Wahl, L.M., & Wahl, S.M. (1992) Inflammation in: Wound Healing: Biochemical & Clinical Aspects. ed. By Cohen I. K., Diegelmann R. F., hindblad W. J., cap 3: 40 – 62.
170. Whawell, S.A., Thompson, J.N. (1995). Cytokine-induced release of plasminogen activator inhibitor-1 by human mesothelial cells. **Eur J Surg**, 161: 315-318
171. Wicznyk, H.P., Grow, D.R., Adams, L.A., *et al.* (1998). Pelvic adhesions contain sex steroid receptors and produce angiogenesis growth factors. **Fertil Steril**; 69: 511-516
172. Williams, R.S., Rossi, A.M., Chegini, N., *et al.* (1992). Effect of transforming growth factor beta on postoperative adhesion formation and intact peritoneum. **J Surg Res**, 52(1), 65-70
173. Wiseman, D.M., Trout, J.R., Diamond, M.P. (1998). The rates of adhesion development and the effects of crystalloid solutions on adhesion development in pelvic surgery. **Fertil Steril**, 70:702–711.
174. Wynn, T.A. (2008) Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. **J Pathol**, 214(2): 199 – 210.

175. Yancopoulos, G.D., Davis, S., Gale, N.W., *et al.* (2000) Vascular – specific growth factor reversal by suranin. **Proc Natl Acad Sci**, 87: 5346 – 5350.
176. Yao, V., Platell, C., Hall, J.C. (2003). Role of peritoneal mesothelial cells in peritonitis. **Br J Surg**, 90:1187–1194.