UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos
Área de Nutrição Experimental

Atividade anti-angiogênica e modulação das proteínas envolvidas na
neoformação vascular por compostos bioativos da própolis

Julio Beltrame Daleprane

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Dr. Dulcinéia Saes Parra Abdalla

São Paulo
2011

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

D139a Daleprane, Julio Beltrame
Atividade anti-angiogênica e modulação das proteínas
envolvidas na neoformação vascular por compostos bioativos da
própolis / Julio Beltrame Daleprane. -- São Paulo, 2011.
136p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição
Experimental

Orientador: Abdalla, Dulcinéia Saes Parra

1. Bioquímica nutricional 2. Dieta : Nutrição experimental
I. T. II. Abdalla, Dulcinéia Saes Parra, orientador.

641.1 CDD

Julio Beltrame Daleprane

Atividade anti-angiogênica e modulação das proteínas envolvidas na
neoformação vascular por compostos bioativos da própolis

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Dulcinéia Saes Parra Abdalla
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, 22 de Julho de 2011.

*Aos meus pais,
Vera e Nelson Daleprane,
alicerces de toda e cada etapa
sonhada e cumprida na minha vida*

AGRADECIMENTOS

Este trabalho não seria realizado se não fosse a participação de diversas pessoas que direta ou indiretamente, através de gesto e/ou palavras tornaram esses 3 anos de árduo trabalho não apenas em cabelos brancos e folhas impressas de papel, mas também em sabedoria que transcendeu o conhecimento científico. Talvez este seja o melhor momento para expressar a minha gratidão e demonstrar o quanto esta torcida e apoio foram de extrema importância.

À minha orientadora Prof^ª. Dr^a. Dulcinéia Saes Parra Abdalla, ou apenas Dulci. Obrigado pela confiança depositada em desenvolver este projeto e pelas oportunidades que foram geradas a mim durante todos esses anos de convivência. Ter trabalhado sob sua orientação me fez crescer e reconhecer que o sucesso profissional é fruto de esforço e dedicação. Espero ter correspondido a todos os desafios que me foram confiados.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 2008/53755), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Deutscher Akademischer Austauschdienst (DAAD) e a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-graduação da Universidade de São Paulo pelos apoios financeiro à mim concedidos.

Aos meus amigos do Laboratório de Bioquímica Clínica, pelas trocas, doações e muitas vezes sacrifícios durante essa jornada. Obrigado pela convivência harmoniosa durante esses anos.

À Tanize e Soraya (JoJo), queridas, que ao tentarem dominar o mundo com suas conversas na bancada ao final da tarde foram sinônimo de

companheirismo e amizade. À Fernanda Cesar, Elaine (cabeça de ovo), Léo, Simone, Marcela, Fernanda Gomes, Priscila, Vitor, Daniel, Karina, Amanda, Mariana, Cris Garcia e Cris. Além de todos funcionários da FCF-USP. À Lú e a Martina, pelas conversas, discussões, piadas, histórias e estórias! Agradeço especialmente à Martina, pelos incentivos, treinamentos e protocolos padronizados! Desejo tudo de bom para sua trajetória como pesquisadora, estou certo do seu sucesso!

À Vanessa Freitas pela intensa companhia e dedicação em seu projeto de Iniciação Científica que juntamente com o esforço dos outros autores gerou o primeiro manuscrito publicado fruto deste trabalho.

As “meninas da Hemato”, Amanda, Karina e Mariana que sempre foram solícitas aos nossos pedidos e necessidades. Muito obrigado!

Aos Funcionários da FCF-USP pelo apoio necessário à execução deste trabalho. Agradeço em especial à Elaine e Jorge (Pós-graduação), Majô (Comitê de Ética), Mônica e Edilson (B14), Flávia e Renata (Biotério), Édina, Suely, Ana e Maurício (B17).

Ao Prof. Dr. Bernhard Brüne e a todo grupo de pesquisa do laboratório Pathobiochemistry 1 da Goethe University em Frankfurt, em especial aos amigos que lá ficaram e que me ajudaram na grande oportunidade de vivenciar uma realidade de pesquisa e cultura tão diferente na nossa. Agradeço em especial à Tobias, Daniela, Johanna, Anne-Marie, Vera, Nico, Heidi, Teresa, Mr. Techel and Mrs. Tausendschön; Dankeschön!

À minha família. Hoje composta não somente por meus irmãos Melania, Olívio e Paulo Henrique, mas também por meus dois queridos sobrinhos, Henrique e Caio. Além dos meus tios e amigos pelo incentivo e

ajuda durante essa jornada. Agradeço em especial, aos meus pais, Vera e Nelson, que por muitas vezes abriram mão de seus sonhos em detrimento das realizações de seus filhos. São exemplos de vida e amor. Saudades eternas da minha grande e incomparável mãe, amo vocês.

E por último, mas não menos importante, agradeço à minha esposa, Irene, que vem me acompanhando nos últimos 8 anos. Uma esposa dedicada que soube respeitar a minha vontade de crescer profissionalmente, e embarcou nessa jornada, acompanhando cada momento de angustia e felicidade. Amor incondicional e respeito, duas palavras que fazem continuamente parte da nossa relação. Te amo!

“Science may set limits to knowledge,
but should not set limits to imagination.”

Bertrand Russell

RESUMO

Daleprane JB. Atividade antiangiogênica e modulação das proteínas envolvidas na neoformação vascular por compostos bioativos da própolis. [Tese de doutorado]. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo; 2011.

Rica em compostos bioativos, a própolis é amplamente utilizada na medicina alternativa como agente preventivo e/ou terapêutico. Neste trabalho, avaliamos o impacto de frações ricas em polifenóis de diferentes própolis no processo de angiogênese na aterosclerose. Foram utilizadas as seguintes amostras de própolis: Red (vermelho, Alagoas-Brasil), Green (verde, Minas Gerais-Brasil) e Brown (marrom, Temuco-Chile), com concentrações semelhantes de polifenóis totais (~32%), porém com diferentes perfis de compostos fenólicos. A suplementação (250 mg/Kg/dia) de camundongos *knockout* para o receptor de LDL (LDLr^{-/-}) com os polifenóis demonstrou que no protocolo de lesão inicial (LI) os grupos suplementados apresentaram menor ($p<0,05$) área de lesão (Green, 726 μm^2 ; Red, 519 μm^2 ; Brown, 698 μm^2) em relação ao controle (GC, 1184 μm^2). Em contraste, no protocolo de lesão avançada (LA) apenas o grupo Red (1082 μm^2) apresentou menor ($p<0,05$) área de lesão em relação ao GC (1598 μm^2). Em ambos os protocolos (LI e LA) observou-se redução ($p<0,05$) na expressão de importantes genes envolvidos no processo de angiogênese (VEGF, MMP9, PDGF e PECAM). No entanto, apenas o grupo tratado com a própolis Red foi capaz de aumentar ($p<0,05$) a expressão de TIMP-1 no protocolo de LI. Todos os tratamentos inibiram ($p<0,05$), em cerca de 45%, a migração de células endoteliais (CE), bem como cerca de 55% do brotamento de tubos de anéis de aorta, em relação ao controle e ao redor de 50% da formação de novos vasos na membrana corioalantóica de embrião de galinha (CAM). Ao investigar o mecanismo de ação dos polifenóis, observamos que os polifenóis da própolis Red (PRP) mostraram-se mais eficazes em modular a expressão do Fator induzido por Hipóxia-1 alfa (HIF-1 α), de modo dose/tempo dependente em células endoteliais. Adicionalmente, os polifenóis da própolis Red (PRP) reduziram a expressão de genes alvos regulados por HIF-1 α como GLUT-1 e ADM, além de inibir a expressão gênica e a secreção de VEGF em meio de cultura. Em presença dos PRP, a degradação de HIF-1 α foi exarcebada e, utilizando-se células RCC4/pVHL (células de carcinoma renal com VHL reintroduzido), observou-se que PRP induzem a desestabilização de HIF-1 α acelerando sua degradação dependente de pVHL. Em células endoteliais, pVHL foi superexpresso devido à inibição de Cdc42, um repressor de pVHL. Conclui-se que os polifenóis oriundos das própolis Green, Red e Brown possuem potencial anti-aterogênico através da inibição da expressão de moléculas inflamatórias e angiogênicas, principalmente quando suplementados ao início do desenvolvimento da lesão aterosclerótica. Além disso, os polifenóis da própolis Red inibem o processo de angiogênese, aumentando a desestabilização de HIF-1 α pelo aumento da degradação via pVHL e induzindo sua expressão em função da repressão de Cdc42.

Palavras-chave: Angiogênese, aterosclerose, polifenóis, própolis, HIF-1 α , pVHL

ABSTRACT

Daleprane JB. Anti-angiogenic activity and modulation of protein-involved in new vases formation by propolis bioactive compounds. [Tese de doutorado]. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo; 2011.

Propolis is rich in bioactive compounds and widely used in alternative medicine as a preventive agent and/or in therapy. We evaluate the impact of polyphenol-rich fractions of propolis from different origins and types in the angiogenesis process in atherosclerotic lesions. The following samples of propolis were used: Red (red, Alagoas, Brazil), Green (green, Minas Gerais, Brazil) and Brown (brown, Temuco, Chile), with similar concentrations of total polyphenols (~ 32%) but with different profiles of phenolic compounds. Supplementation (250 mg / kg / day) of knockout mice for the LDL receptor (LDLr-/-) with polyphenols showed that in the initial lesion (LI) protocol supplemented groups had lower ($p < 0.05$) lesion area (Green, $726\mu\text{m}^2$; Red, $519\mu\text{m}^2$; Brown $698\mu\text{m}^2$) compared to control (GC, $1184\mu\text{m}^2$). In contrast, in the advanced lesions (LA) protocol only the Red group ($1082\mu\text{m}^2$) had smaller lesion area ($p < 0.05$) compared to GC ($1598\mu\text{m}^2$). In both protocols (LI and LA) a reduction ($p < 0.05$) of important genes expression involved in angiogenesis (VEGF, MMP9, PDGF and PECAM) was observed. However, only the group treated with Red propolis was able to increase ($p < 0.05$) the expression of TIMP-1 in the LI protocol. The treatments with all types of propolis inhibited ($p < 0.05$), about 45% the migration of endothelial cells (EC), approximately 55% of tubes formation in aortic rings and almost 50% of formation of new vessels in the chorioallantoic membrane of chick embryo (CAM) compared to the control. While investigating the mechanism of polyphenols action, it was found that polyphenols from Red propolis (PRP) were more effective in modulating the expression of hypoxia-induced factor-1 alpha (HIF-1 α) in a dose/time dependent way in EC. Additionally, the polyphenols from red propolis (PRP) reduced the expression of target genes regulated by HIF-1 α as GLUT-1, ADM, VEGF besides the VEGF protein secretion in the EC culture medium. In the presence of PRP, the degradation of HIF-1 α was exacerbated in RCC4/pVHL cells (renal cell carcinoma with VHL reintroduced); moreover, PRP induced destabilization of HIF-1 α accelerating the degradation of this transcription factor by a pVHL-dependent pathway. In EC, pVHL was over expressed by inhibition of Cdc42, a repressor of pVHL. We conclude that the polyphenols from Green, Red and Brown propolis have anti-atherogenic potential by inhibiting the expression of angiogenic and inflammatory genes, especially when supplemented at an early stage of the atherosclerotic lesion development. In addition, the polyphenols from Red propolis inhibit the angiogenesis process by increasing the destabilization of HIF-1 α via over expression of pVHL-degradation induced by repressed Cdc42 function.

Key-words: Angiogenesis, atherosclerosis, polyphenols, propolis, HIF-1 α , pVHL

LISTA DE ABREVIações

CAM	Membrana corioalantóica
ApoB	Apolipoproteína B
ApoE ^{-/-}	Camundongos <i>knockout</i> para receptores de Apolipoproteína E
ARNT	Translocador Nuclear de Receptor Aril
bHLH	Hélice-alça-hélice básica
CAPE	Éster feniletílico do ácido cafeico
CD36	Receptor da trombospondina
CEEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CFSE	Diacetato de carboxi-fluoresceína, succinimidil Ester
CHX	Ciclohexamida
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DEPC	Dimetil pirocarbonato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMOG	Dimethyloxallyl Glycine
EGF	Fator de crescimento endotelial
FGF	Fator de crescimento de fibroblasto
FIH-1	Fator de inibição do HIF
GM-CSF	Fator estimulante de colônia de granulócitos e macrófagos
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HIF-1	Fator induzível por hipóxia - 1
HO-1	Heme oxigenase-1
HRE	Elemento responsivo à hipóxia
HUVEC	Célula endotelial de cordão umbilical humano
ICAM	Molécula de adesão intracelular
IFN-γ	Interferon-gama
IL	Interleucina
LA	Lesão avançada
LDL ^{-/-}	Camundongos <i>knockout</i> para o gene do receptor de LDL
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LI	Lesão inicial

M-CSF	Fator estimulador de colônia de macrófagos
MCP-1	Proteína quimiotática para monócitos
MMP	Metaloprotease
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazólio
NADP	Fosfato de nicotidamina adenina dinucleotídeo
Non-HDL-C	Fração de colesterol não HDL
ODD	Domínio de degradação dependente de oxigênio
oxLDL	Lipoproteína de baixa densidade oxidada
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PECAM-1	Molécula de adesão celular endotelial plaquetária
PHD	Prolil-hidroxilase
PI3K	Fosfatidilinositol 3 quinase
PRP	Polifenóis da Red propolis
pVHL	Proteína do gene supressor de tumor von Hippel-Lindau
RNA _m	RNA mensageiro
RCC4	Linhagens celulares de carcinoma renal
RCC4/pVHL	RCC4 com pVHL reintroduzido
RNA	Ácido ribonucleico
SFB	Soro fetal bovino
SR	Receptores <i>scavenger</i>
TAG	Triacilglicerol
TGF- β	Fator de crescimento derivado de tumor
TIMP	Inibidor tissular de metaloproteases
TNF- α	Fator-alfa de necrose tumoral
VCAM-1	Molécula de adesão de célula vascular
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VEGFR	Receptor do fator de crescimento endotelial vascular
VSMC	Célula vascular de músculo liso
VV	<i>Vaso vasorum</i>

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1 Ingredientes adicionados para manipulação da ração experimental.....	40
Tabela 2 Sequência de <i>primers</i> utilizados para o ensaio com camundongos LDLr ^{-/-}	46
Tabela 3 Concentração de polifenóis totais nas amostras de própolis Green, Red e Brown.....	60
Tabela 4 Perfil bioquímico (Triacilglicerol, colesterol total, HDL-C, non-HDL colesterol) dos grupos experimentais submetidos aos protocolos de Lesão Inicial (LI) e lesão Avançada (LA) tratados com polifenóis das diferentes própolis.....	65

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 01 Esquema ilustrativo do início e progressão da aterosclerose.....	24
Figura 02 Esquema representativo de HIF-1 α , HIF-2 α e ARNT humano.....	29
Figura 03 Atividade de HIF em hipóxia e normóxia.....	32
Figura 04 Cromatogramas das amostras de própolis Green, Red e Brown..	61
Figura 05 Evolução ponderal dos animais suplementados com polifenóis das diferentes própolis: Green, Red e Brown (250 mg/Kg/dia).....	63
Figura 06 Análise da área (μm^2) das lesões ateroscleróticas da raiz da aorta dos camundongos LDLr ^{-/-} (n=5/grupo) submetidos à dieta hipercolesterolêmica no protocolo de lesão Inicial (LI) e Lesão Avançada (LA).....	67
Figura 07 Expressão relativa (U.A.) de genes envolvidos no processo de formação e progressão da placa de ateroma em camundongos LDLr ^{-/-} , submetidos ao protocolo de lesão inicial (LI).....	70
Figura 08 Expressão relativa (U.A.) de genes envolvidos no processo de formação e progressão da placa de ateroma camundongos LDLr ^{-/-} , submetidos ao protocolo de lesão avançada (LA).....	71
Figura 09 Expressão relativa (U.A.) de genes envolvidos no processo angiogenico na placa de ateroma de camundongos LDLr ^{-/-} , submetidos ao protocolo de lesão avançada (LI).....	72
Figura 10 Expressão relativa (U.A.) de genes envolvidos no processo angiogenico na placa de ateroma em camundongos LDLr ^{-/-} , submetidos ao protocolo de lesão avançada (LI).....	73
Figura 11 Expressão de molécula de adesão PECAM e VCAM em lesão aterosclerótica de camundongos deficientes para receptores de LDLr ^{-/-} nos protocolos de LI e LA.....	75
Figura 12 Influência dos diferentes polifenóis na viabilidade de células endoteliais incubadas por 24h com distintas concentrações (0,1-100 $\mu\text{g/mL}$) de polifenóis totais das diferentes própolis.....	77

Figura 13	Proliferação de células HUVEC tratadas com os polifenóis das diferentes própolis utilizando a técnica de citometria de fluxo e CFSE como fluorófilo.....	78
Figura 14	Proliferação de células HUVEC tratadas com os polifenóis das diferentes própolis utilizando a técnica de incorporação de timidina tritiada.....	80
Figura 15	Efeito do tratamento com polifenóis da própolis sobre a migração celular de células endoteliais (HUVEC e EA.h926).....	82
Figura 16	Influencia dos tratamentos com polifenóis no brotamento de novos vasos em anéis de aorta.....	83
Figura 17	Influencia dos polifenóis da própolis na angiogênese da Membrana Coreoalantóica do Embrião de galinha (CAM).....	84
Figura 18	Cinética de expressão de RNAm VEGF nos tempos 2, 4, 8, 16 horas.....	86
Figura 19	Representação gráfica do ensaio de <i>SuperArray</i>	87
Figura 20	Expressão relativa dos principais genes (RNAm, UA) envolvidos no processo de angiogênese e avaliados através do <i>SuperArray</i>	88
Figura 21	Os polifenóis da propolis não influenciam a expressão de RNAm de HIF-1 α e AKT e pAKT, mas modulam a expressão de HIF-1 α	89
Figura 22	Auto diferenciação de <i>stem cells</i> em células positivas para CD31.....	90
Figura 23	PRP inibe a expressão de VEGF em células endoteliais (CE's)..	92
Figura 24	PRP inibe a expressão da proteína HIF-1 α e seus genes dependentes.....	94
Figura 25	PRP regula a expressão de HIF-1 α em parte acelerando a degradação de HIF-1 α via mecanismo dependente de pVHL.....	96
Figura 26	PRP bloqueia a expressão de HIF-1 α aumentando a expressão de pVHL sob hipoxia (1% O ₂) e inibindo a expressão de Cdc42..	97

SUMÁRIO

	Pág.
1.0 INTRODUÇÃO.....	19
1.1 Polifenóis da própolis.....	19
1.2 Aterosclerose.....	21
1.3 Angiogênese na aterosclerose.....	24
1.4 Regulação de HIF-1 α	28
2.0 OBJETIVOS.....	34
2.1 Objetivo Geral.....	34
2.2 Objetivos específicos.....	34
3.0 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.1 Amostras de própolis.....	35
3.2 Preparo das frações ricas em polifenóis.....	36
3.3 Análise quantitativa dos polifenóis totais.....	37
3.4 Análise qualitativa por LC/MS dos polifenóis encontrados nas amostras de própolis.....	37
3.5 Ensaio experimental <i>in vivo</i> utilizando camundongos LDLr ^{-/-} suplementados com polifenóis da própolis.....	38
3.5.1 Animais.....	38
3.5.2 Delineamento experimental.....	39
3.5.3 Grupos experimentais.....	41
3.5.4 Análise bioquímica do perfil lipídico sérico.....	41
3.5.5 Preparação dos tecidos para processamento.....	42
3.5.6 Preparação dos tecidos para os cortes histológicos.....	43
3.5.7 Análise morfométrica.....	44
3.5.8 Extração do RNAm da área de lesão aterosclerótica.....	44
3.5.9 Construção do DNA complementar (cDNA).....	45
3.5.10 Expressão gênica (RNAm).....	45
3.5.11 Expressão de moléculas de adesão PECAM-1 e VCAM-1.....	47

3.6 Avaliação dos polifenóis das própolis no processo de angiogênese.....	48
3.6.1 Condições de cultura celular.....	48
3.6.2 Viabilidade celular.....	49
3.6.3 Proliferação celular.....	50
3.6.4 Migração celular.....	52
3.6.5 Ensaio <i>ex-vivo</i> de brotamento de anel de aorta.....	53
3.6.6 Membrana Corioalantóica de Embrião de Galinha (CAM).....	54
3.6.7 Ensaio de autodiferenciação de <i>stem cells</i> em células CD31 positivas.....	55
3.6.8 Ensaio com <i>SuperArray</i>	57
3.6.9 <i>Western blot</i>	57
3.7 Análise da secreção de VEGF.....	58
3.8 Análise estatística.....	59
 4. RESULTADOS.....	 60
4.1 Polifenóis totais e perfil de compostos polifenólicos.....	60
4.2 Influência da suplementação de polifenóis extraídos da própolis em camundongos LDLr ^{-/-}	62
4.2.1 Evolução ponderal e consumo de ração.....	62
4.2.2 Influência da suplementação com polifenóis da própolis no perfil bioquímico dos animais LDLr ^{-/-}	64
4.2.3 Influência da suplementação com polifenóis das diferentes própolis no desenvolvimento da área de lesão aterosclerótica....	66
4.2.4 Avaliação da expressão gênica (RNA _m) na área de lesão aterosclerótica nos diferentes protocolos experimentais.....	68
4.3 Influência dos polifenóis da própolis na viabilidade de células endoteliais.....	76
4.4 Proliferação celular.....	77
4.5 Polifenóis da própolis inibem a migração de células endoteliais..	81
4.6 Polifenóis da própolis inibem a organização de células endoteliais para a formação de microvasos.....	83
4.7 Polifenóis da própolis inibem a formação de novos vasos.....	84

4.8 Modulação da expressão de genes alvo envolvidos na angiogênese por polifenóis da própolis.....	85
4.9 Polifenóis da própolis modulam de distintas maneiras o fator de transcrição HIF-1 α	89
4.10 Polifenóis da própolis Red (PRP) inibem a auto-diferenciação de <i>stem cells</i> em células CD31 positivas.....	90
4.11 PRP inibe a expressão de VEGF em células endoteliais.....	91
4.12 PRP inibe a expressão HIF-1 α de modo dose e tempo dependente e a expressão dos seus principais genes alvo.....	93
4.13 PRP diminui a estabilidade da proteína HIF-1 α	95
4.14 PRP induz a expressão de pVHL através da inibição de Cdc42	97
5. DISCUSSÃO.....	98
6 CONCLUSÃO.....	108
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	109
ANEXOS.....	126
ANEXO 1 Lista de genes analisados no <i>Super Array</i>	127
ANEXO 2. Aprovação do projeto pelo Comitê de Ética e Pesquisa Animal.....	132
ANEXO 3 Certificação do Laboratório e Aprovação do projeto pela Comissão Interna de Biossegurança FCFUSP.....	134
ANEXO 4 Artigo aprovado para publicação no <i>Journal Nutritional Biochemistry</i>	136
ANEXO 5 Artigo submetido e em análise para publicação no <i>Journal of Nutrition</i>	147
ANEXO 6 Informações para os membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado.....	183
ANEXO 7 Ficha do aluno –FCF-USP.....	185
ANEXO 8 Currículo Lattes.....	188

1. INTRODUÇÃO

1.1 Polifenóis da própolis

Própolis é uma substância resinosa elaborada pelas abelhas com o objetivo de proteger suas colméias contra a ação de outros insetos e de diversos agentes infecciosos. Sua composição é muito variável e está diretamente relacionada com a diversidade botânica, condições ambientais e região geográfica nas quais se encontram as abelhas (Viuda-Martos *et al.*, 2008).

Normalmente a própolis é constituída por diversas resinas, ceras, óleos essenciais, pólen e vários compostos orgânicos, incluindo os polifenóis, o que dá origem às suas diversas propriedades funcionais. Embora a composição química da própolis seja um dado extremamente importante, suas distintas atividades farmacológicas podem também decorrer da sinergia entre seus diversos componentes (Krol *et al.*, 1993). Os principais compostos químicos isolados da própolis até o momento podem ser organizados em alguns principais grupos como: ácidos e ésteres alifáticos, ácidos e ésteres aromáticos, açúcares, alcoóis, aldeídos, ácidos graxo, aminoácidos, esteróides, cetonas, charconas e di-hidrocharconas, flavonóides (flavonas, flavonóis e flavononas), terpenóides, proteínas, vitaminas B1, B2, B6, C, E, bem como diversos minerais (Salomão *et al.* 2009; Benkovic *et al.* 2009). Os polifenóis mais freqüentemente encontrados em própolis brasileiras são: pinocembrina, pinobanskina, crisina, kaempferol, genisteína, apigenina, galangina e ácido caféico (Bankova *et al.*, 2002; Volpi

& Bergonsini *et al.*, 2006; Adelman *et al.*, 2007). A presença e a concentração destes compostos podem ser utilizadas como índice de qualificação de amostras de própolis (Lu *et al.*, 2004).

Segundo Beecher (2003) e Manach *et al.* (2004), os polifenóis são compostos fenólicos que compreendem um amplo grupo de substâncias naturais não sintetizadas pelos animais. A ingestão destes compostos interfere em diversos processos fisiológicos, auxiliando na absorção e na ação de vitaminas, atuando nos processos de cicatrização, atividade anti-inflamatória (Dou 2009), anti-bacteriana (Bengmark *et al.* 2009), anti-viral (Maurin *et al.* 2003), imunomodulatória (Williams *et al.*, 2004) e anti-oxidante (Pavilonis *et al.* 2008; Rodrigues *et al.* 2009).

Pesquisas utilizando modelos experimentais de camundongos (Menezes *et al.*, 1999) e coelhos (Oztürk *et al.*, 2000) demonstraram atividade antiinflamatória de soluções hidroalcoólicas da própolis, tanto em aplicações tópicas, bem como através de injeções intra peritoniais (IP) ou mesmo via oral. Song *et al.*, (2002) atribuíram à própolis propriedade anti-inflamatória, que estaria relacionada à presença de compostos tais como o ácido cafeico, quercetina, narigenina e o éster fenetílico do ácido cafeico (CAPE). Descreveram ainda que esta atividade seria resultante da supressão da síntese de prostaglandinas e de leucotrienos em macrófagos. A participação do CAPE isolado da própolis na inibição da síntese de prostaglandinas foi também constatada por Borrelli *et al.* (2002). Além destes compostos, Krol *et al.* (1996) caracterizaram na própolis mais outros 15 compostos que, conhecidamente, apresentam esta atividade antiinflamatória, entre eles o ácido salicílico, a apigenina, o ácido felúrico e a galangina. A inibição na geração de óxido nítrico por macrófagos é também apontada como um dos fatores responsáveis pela atividade antiinflamatória da própolis (Nagaoka *et al.*, 2003).

Os polifenóis apresentam ainda atividade antioxidante, tendo a capacidade de diminuir os efeitos adversos das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio sobre as células do organismo. Seus efeitos benéficos já descritos incluem uma variedade de propriedades farmacológicas, incluindo atividade antiproliferativa em células tumorais (Touriño *et al.*, 2008; Etcheverry *et al.*, 2008; Kampa *et al.*, 2004). Apesar da influência do consumo dos polifenóis ser extensivamente estudada em doenças cardiovasculares, assim como a influência da própolis na angiogênese (Chikaraishi *et al.*, 2009; Ohta *et al.*, 2008; Ahn *et al.*, 2007; Izuta *et al.*, 2009; Moura *et al.*, 2009), ainda não há trabalhos que associam o impacto do consumo de polifenóis extraídos da própolis sobre a angiogênese na aterosclerose e os mecanismos de ação envolvidos neste processo.

1.2 Aterosclerose

Aterosclerose pode ser definida como um processo inflamatório crônico e degenerativo que acomete as grandes e médias artérias, sendo caracterizada pelo acúmulo, no espaço subendotelial da íntima arterial, de lipídeos, células inflamatórias, proteínas da matriz extracelular e uma cápsula fibrosa formada por células musculares lisas (Lusis, 2000; Tabas, 2010; Vergeer & Stroes, 2009; Simon *et al.*, 2010).

O evento inicial da aterosclerose é caracterizado pelo acúmulo de partículas de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) na matriz subendotelial da camada íntima das artérias. Este acúmulo é diretamente proporcional aos níveis de LDL-colesterol circulante, e tanto o seu transporte através do endotélio como a sua retenção na íntima, serão mais eficientes nos locais de maior suscetibilidade à formação da lesão como as

regiões de bifurcação das artérias (Lusis, 2000; Hackam & Anand, 2003; Libby, 2002; Fuster, 1994).

A fração LDL presente na corrente sanguínea transmigra passivamente através das células endoteliais e sua retenção na parede das artérias envolve interações entre a apolipoproteína B (apoB), que faz parte da sua constituição, e os proteoglicanos que estão presentes na matriz extracelular da camada subendotelial das artérias. Uma vez retida no espaço subendotelial, a partícula de LDL poderá ser quimicamente modificada, assim contribuindo para o processo inflamatório. A modificação química mais significativa para o início da formação da lesão é a oxidação, com conseqüente formação da LDL oxidada (ox-LDL; Badimon *et al.*, 1993; Cybulsky *et al.*, 2001; Collins & Cybulsky, 2001).

A modificação oxidativa das partículas da LDL é resultado da ação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e de certas enzimas, tais como mieloperoxidase, xantina oxidase, NADPH-oxidase, fosfolipases e outras lipases (Lusis, 2000). A ox-LDL estimula a camada de células endoteliais a produzir moléculas de adesão celular como a molécula-1 de adesão da célula vascular (VCAM-1), molécula-1 de adesão intercelular (ICAM-1), fatores de crescimento, tal como fator estimulador de colônia de macrófago (M-CSF) e proteínas quimiotáticas, como a proteína-1 quimiotática para monócitos (MCP-1), resultando no recrutamento e adesão de monócitos e linfócitos circulantes para dentro da parede arterial (Lusis, 2000).

Uma vez estabelecidos na íntima arterial, os monócitos adquirem as características morfológicas de macrófagos, os quais internalizam as partículas de ox-LDL através de um grupo de receptores *scavenger* (tais como, SR-A e CD36), com

consequente formação das células espumosas ou “*foam cells*”, que se caracterizam pelo acúmulo de lipídeos no seu interior.

No espaço subendotelial, os macrófagos secretam várias citocinas, tais como o fator-alfa de necrose tumoral (TNF- α) e interleucina-1 (IL-1) que também estimulam a expressão das moléculas de adesão pelas células endoteliais, favorecendo ainda mais o recrutamento dos monócitos e a formação de *foam cells*. As citocinas, como TNF- α e interferon-gama (IFN- γ), são responsáveis por estimularem a expressão dos receptores *scavenger* na superfície dos macrófagos (Kleemann *et al.*, 2008; Lüscher, 2000).

Uma vez que o conteúdo de colesterol internalizado pelos macrófagos via receptores *scavenger* não é controlado por *feedback* negativo, ocorre o acúmulo de células espumosas na camada íntima das artérias, originando as estrias gordurosas. Estas lesões iniciais podem tornar-se avançadas e complexas, com a presença de calcificação, erosão ou ulceração e hemorragia (Lüscher, 2000).

Figura 01. Esquema ilustrativo do início e progressão da aterosclerose. (1) VCAM-1 promove a adesão de monócito. (2) MCP-1 medeia a migração de monócito para a íntima do vaso. (3) M-CSF promove a maturação e a diferenciação de monócitos em macrófagos. (4) Transmigração e deposição de LDL do lúmen para íntima e modificação oxidativa da LDL em Ox-LDL. (5) Ox-LDL é internalizada pelos macrófagos através de SR transformando-se em células espumosas. (6) Células T promovem a proliferação e migração de VSMC para íntima do vaso. (7) Formação da placa de ateroma: células espumosas são cercadas por VSMC. Macrófagos, células T, e VSMC secretam citocinas pró-inflamatórias e colagenases que agravam o processo de aterosclerose podendo provocar um evento trombótico hemorrágico. Abreviações: VCAM-1, molécula de adesão celular-1; MCP-1, proteína quimiotática de monócito-1; M-CSF, fator estimulador de colônia de macrófago; VSMC, célula vascular de músculo liso; RS, receptores scavenger (Adaptado Basu & Penegonda, 2009).

1.3 Angiogênese na aterosclerose

Embora as lesões ateroscleróticas avançadas possam tornar-se suficientemente grandes até o ponto de bloquear o fluxo sanguíneo, a complicação clínica mais significativa é o rompimento da capa fibrosa que recobre a lesão, com consequente formação de trombos ou coágulos, os quais poderão obstruir vasos de menor calibre, resultando, por exemplo, em infarto agudo do miocárdio, acidente vascular cerebral ou

acometimento dos membros inferiores (Slevin *et al.*, 2006).

A ruptura da placa é uma complicação importante da aterosclerose e ocorre, principalmente, em lesões com presença de capa fibrosa fina, permitindo a exposição do seu conteúdo lipídico e do infiltrado inflamatório aos componentes do fluxo sanguíneo, promovendo então a cascata de coagulação, agregação plaquetária e trombose (Lusis, 2000).

Estudos observacionais de progressão necrótica da lesão aterosclerótica indentificaram a vascularização intraplaca como um fator crítico para o crescimento e desestabilização da placa aterosclerótica. Ademais, o processo de formação de novos vasos está estreitamente associado à progressão da lesão aterosclerótica, sendo a neovascularização íntimal predominantemente originada a partir da “*vaso vasorum*” presente na camada adventícia das artérias (VV; Herrmann *et al.*, 2006).

Diversos estudos (Caine *et al.*, 2004; Fishbein *et al.*, 2008; Folkman, 1971; Chen & Walterscheid, 2006; Krupinski *et al.*, 2003) demonstram que o microambiente da lesão aterosclerótica estimula o desenvolvimento vascular anormal caracterizado por ramificações desorganizadas e imaturas de neovasos. Esta rede de vasos sanguíneos imaturos é fonte potencial de hemorragia intraplaca, uma vez que pode fornecer fosfolipídios e colesterol livre derivados da membrana eritrocitária. A mudança no substrato da placa causada pelo acúmulo excessivo de eritrócitos pode promover a transição de uma lesão estabilizada para evolução até uma lesão instável.

Na placa aterosclerótica, o infiltrado inflamatório aumenta o recrutamento de monócitos que, após a diferenciação em macrófagos, secretam metaloproteinases (MMPs) e aumentam a expressão de interferon- γ (a partir de linfócitos -T), que podem

enfraquecer a cápsula fibrosa e, de modo semelhante, podem induzir à síntese de fatores de crescimento e interleucina-8 (IL-8; Zhang *et al.*, 2009).

A correlação de infiltrados de células inflamatórias com áreas de neovascularização e hemorragia intraplaca sugere que a liberação de fatores de crescimento e citocinas por macrófagos e linfócitos podem ter um papel fundamental na modulação do processo de neovascularização.

A presença do meio neovascular ou “*hotspots*” foi evidenciada em lesões de camundongos *knockout* para receptores de apolipoproteína E (ApoE^{-/-}) onde a densidade de “*vasa vasorum*” foi correlacionada à presença de células inflamatórias e ao tamanho da lesão. Além disso, a deposição de glóbulos vermelhos no interior do núcleo necrótico das placas ateroscleróticas também resulta em aumento da infiltração de macrófagos e, portanto, pode potencializar a resposta inflamatória sistêmica (Moreno *et al.*, 2006; Moulton *et al.*, 2006; Napoli *et al.*, 2006; Piao & Tokunaga, 2006).

Outro ponto é que, a hipercolesterolemia pode estar associada com a proliferação de “*vasa vasorum*” em vasos coronários e carótida em estágios iniciais de desenvolvimento da placa aterosclerótica. Williams *et al.* (2004) demonstraram que a presença de aterosclerose em macacos hipercolesterolêmicos induziu um aumento no fluxo sanguíneo na área de lesão de artérias através do aumento de “*vasa vasorum*”. Após a retirada da dieta hiperlipídica ocorreu regressão da “*vasa vasorum*” e do fluxo sanguíneo para os meios coronários e a íntima. Adicionalmente, segundo Araújo *et al.* (2010), níveis elevados de colesterol estão associados com níveis aumentados de expressão de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e pode causar aumento da regulação dos receptores de fatores angiogênicos, tanto em células endoteliais quanto em células de músculo liso.

O VEGF é um potente fator de crescimento angiogênico, estimulando a mitogênese de células endoteliais e a consequente formação de vasos sanguíneos através da ativação de intermediários de sinalização intracelular, incluindo a proteína quinase ativada por mitógenos (*mitogen-activated protein kinase* 1/2, MAPK1/2). A expressão aumentada de VEGF e seus receptores em zonas hipóxicas, em associação com a interação com integrinas da membrana celular (incluindo $\alpha 5\beta 3$) é uma das principais causas da formação de novos vasos (Jiang *et al.*, 2000)

No estado quiescente, a “*vasa vasorum*” de artérias normais fornece nutrientes à túnica média, enquanto a íntima é alimentada pela difusão de oxigênio a partir da luz do vaso. A “*vasa vasorum*” permanece em estado quiescente, provavelmente devido ao equilíbrio angiogênico ou “*angiogenic switch*” que é regulado pela expressão e síntese de fatores anti-angiogênicos, por exemplo, a trombospondina e a endostatina, e fatores pró-angiogênicos. No entanto, durante o desenvolvimento da placa aterosclerótica, o equilíbrio entre fatores pro- e anti-angiogênicos pode se tornar alterado, influenciado pela produção de fatores de crescimento e citocinas, juntamente com uma redução da expressão de moduladores inibitórios, resultando no desequilíbrio do pró-angiogênico (Kim *et al.*, 2003; Folkman *et al.*, 2001).

Diversos estudos (Antonov *et al.*, 2004; Barret & Benditt, 1988; Bobik *et al.*, 1999; Ignatescu *et al.*, 1999; Lappalainen *et al.*, 2004; Lupia *et al.*, 2003; Lupu *et al.*, 1995; Ma *et al.*, 2002; Nakata *et al.*, 1996) têm demonstrado a expressão de mais de 10 fatores pró-angiogênicos em lesões ateroscleróticas humanas, os quais são secretados por macrófagos, células musculares lisas vasculares e células endoteliais. Embora a presença desses diversos fatores pró-angiogênicos esteja bem descrita em lesões ateroscleróticas, o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é o fator pró-

angiogênico mais bem caracterizado (Celletti *et al.*, 2001). Segundo Couffinhal *et al.* (1997), apesar da expressão pós-natal de VEGF ser uma característica de vasos sangüíneos normais, a expressão deste fator pró-angiogênico encontra-se aumentada em lesões ateroscleróticas.

Além disso, o espessamento da íntima e da média, em função da formação da placa de ateroma, pode resultar em uma oferta limitada de oxigênio e nutrientes nessas áreas, proporcionando um ambiente hipóxico com consequente estímulo de fatores pro-angiogênicos pela expressão do Fator Induzível por Hipóxia (HIF). Uma vez que o principal resultado da hipóxia é o aumento da vascularização, os vasos sangüíneos intraplaca podem proliferar em associação a esse potente estímulo. O HIF-1 é expresso em regiões hipóxicas de expansão e desenvolvimento de placas e estimula o crescimento de vasos (organização de células endoteliais) em direção ao ambiente hipóxico via sinalização direta do HIF-1, que regula a expressão do gene VEGF e a posterior indução da sua transcrição (Hoenig *et al.*, 2008).

1.4 Regulação de HIF-1 α

O fator de transcrição HIF-1 é um heterodímero proteico básico que regula a transcrição dos elementos responsivos à hipóxia (HREs – *Hypoxia-responsive elements*) e possui as subunidades HIF-1 α , de HIF-2 α e HIF-3 α , sendo a primeira mais importante e melhor descrita até o momento. O HIF-1 apresenta ainda uma subunidade HIF-1 β , que é constitutivamente expressa. As subunidades de HIF-1 pertencem ao subgrupo da família de fatores de transcrição básicos hélice-alça-hélice (bHLH - *basic helix-loop-*

helix), a qual contém o elemento PAS. O termo PAS é derivado dos membros fundadores desta família, PER-ARNT-SIM (*Period Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator single-minded*; Sato *et al.*, 2008). Em geral, a família de proteínas PAS pode ser considerada como sensores ambientais em razão de suas ações no ritmo circadiano, tais como: influência sobre a digestão, estado de vigília, crescimento e renovação de células e regulação da temperatura corporal (Evans *et al.*, 2009). A proteína SIM é uma proteína pertencente também à família bHLH envolvida na especificação do destino celular durante a diferenciação. PER é conhecido por estar envolvido na manutenção do ritmo circadiano, não possui a região bHLH e pode atuar de forma inibitória. A ARNT é uma proteína translocadora nuclear (Fedele *et al.*, 2002; Figura 02).

A atividade do HIF-1 é regulada por um mecanismo de modificação pós-transcricional de HIF-1α, aumentando a estabilidade proteica e a capacidade de transativação. A subunidade HIF-1α possui dois domínios terminais de transativação: o domínio N terminal (NTAD - N-terminal transactivation domain) e o C terminal (CTAD - C-terminal transactivation domain). O domínio N terminal é também chamado de domínio de degradação dependente de O₂ (ODD – oxygen-dependent degradation), o qual confere a regulação do nível protéico de HIF-1α em função da concentração do oxigênio

molecular. A principal função do CATD é recrutar e interagir com proteínas co-ativadoras transcricionais como a CBP/p300 (Co-activators Binding Protein/p300; Fedele *et al.*, 2002).

Na presença de oxigênio, o HIF-1 α sofre várias modificações como a hidroxilação de dois resíduos de prolina, Pro⁴⁰² e Pro⁵⁶⁴ no domínio ODD e a acetilação de um resíduo de lisina. Essas modificações são mediadas por proteínas que apresentam os domínios prolil hidroxilase (PHDs – *Prolyl Hydroxylases*) ou HIF prolil hidroxilase (HPHs). As PHDs são enzimas muito específicas e extremamente sensíveis a oscilações do concentração de oxigênio celular, devido ao fato de suas atividades serem dependentes de condições adequadas de oxigenação, tornando-os, portanto, autênticos sensores do nível de oxigênio em sistemas biológicos (Percy *et al.*, 2006). A hidroxilação destes resíduos promove uma interação de alta afinidade entre HIF-1 α e a proteína do gene supressor de tumor von Hippel-Lindau (pVHL – von Hippel-Lindau protein). A proteína de von Hippel-Lindau ou pVHL funciona como um substrato de reconhecimento a um complexo ubiquitina ligase E3 que medeia a ubiquitinação do HIF-1 α , levando à sua rápida degradação via proteassomo (Zhou *et al.*, 2006).

Outro tipo de regulação do HIF-1 α ocorre por meio da hidroxilação de um resíduo de asparagina, Asn⁸⁰³, localizado na região CTAD. Esta modificação que é mediada pelo fator de inibição do HIF (FIH-1 - Factor Inhibiting HIF-1), bloqueia a interação do CTAD com o co-ativador transcricional CBP/p300, inibindo assim a transativação mediada pelo HIF-1 α . Além disso, foi recentemente demonstrado que FIH-1 pode diminuir a atividade da subunidade HIF-1 α mesmo em situações de hipóxia severa, sendo, portanto, um mecanismo potencial de regulação do HIF-1 em condições nas quais as PHDs não são capazes de atuar (Marxsen *et al.*, 2004). FIH-1 também interage com o VHL, facilitando

o recrutamento de HIF-1 α para subsequente ubiquitinação e degradação desta subunidade (Zhou *et al.*, 2006).

Quando os níveis de oxigênio celular diminuem, a modificação e degradação do HIF-1 α cessam, havendo um rápido acúmulo do HIF-1 α no citoplasma e sua translocação para o núcleo, onde ocorre sua dimerização com o HIF-1 β (ARNT – Aryl *Hydrocarbon Nuclear Translocator*, ou, Translocador Nuclear de Aril Hidrocarbonetos) e o complexo HIF-1 α formado tornando-se transcricionalmente ativo (Marxsen *et al.*, 2004). O complexo HIF-1 α /HIF-1 β inicia a transcrição de genes alvo ligando-se a uma sequência de pentanucleotídeos (RCGTG) no DNA, denominada elementos responsivos à hipóxia (HREs; Pagé *et al.*, 2002).

Figura 03. A atividade de HIF-1α em hipóxia e normóxia. Durante normóxia, a hidroxilação nos dois resíduos de prolina promovem a associação de HIF-1 com pVHL e consequente destruição de HIF-1 através do sistema de sinalização ubiquitina/proteossoma, enquanto a hidroxilação em um resíduo de asparagina bloqueia a associação com os coativadores. Em hipóxia, este processo está suprimido, deixando as subunidades de HIF escapar da proteólise, dimerizando com HIF-1 beta, recrutando coativadores e ativando a transcrição via HREs. N, asparagina; P, prolina; OH, hydroxyl group; Ub, ubiquitina (Adaptado de Ratcliffe, 2007).

Considerando que a aterosclerose é uma das principais causas de doença cardiovascular na população dos países ocidentais e, juntamente com o câncer, é uma das maiores causas de morte, sendo bem documentada a relação entre a placa de ateroma e o aparecimento de condições de hipóxia e angiogênese, delineou-se o presente estudo. A maior justificativa deste estudo refere-se à extrema importância do desenvolvimento de ferramentas para prevenção e/ou terapia da doença aterosclerótica associada com o processo de angiogênese. Dada a diversidade de própolis presente no Brasil e em outros países e considerando-se as suas várias atividades biológicas, assim como a importância da descrição de novas substâncias que possam atuar em diferentes alvos terapêuticos, visamos elucidar a influência de frações ricas em polifenóis da própolis na angiogênese presente na aterosclerose.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral:

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de frações ricas em polifenóis extraídos de diferentes tipos de própolis no processo de angiogênese presente na aterosclerose.

2.2 Objetivos específicos:

- Identificar a concentração de polifenóis totais e os principais compostos bioativos presentes nas diferentes própolis;
- Avaliar o impacto da suplementação *in vivo* com a fração rica em polifenóis extraídas da própolis no desenvolvimento da placa de ateroma;
- Descrever a expressão de genes envolvidos na angiogênese presentes no processo aterosclerótico;
- Avaliar os efeitos das frações ricas em polifenóis nas etapas do processo angiogênico (proliferação, migração e capacidade de formação de novos vasos);
- Descrever a influência dos polifenóis sobre o Fator Induzido por Hipóxia-1alfa (HIF-1 α), assim como seus genes alvo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostras de própolis

Para obtenção da fração rica em polifenóis foram utilizadas três amostras de própolis de diferentes localidades, sendo elas: Red, coletada na região nordeste do Brasil - estado de Alagoas, produzida por abelhas *Apis mellifera* e com origem botânica da *Dalbergia ecastophyllum* (L.) Taub. A amostra de própolis foi concedida em caráter de doação por meio de colaboração com Prof. Masaharu Ikegak, do Departamento de Farmácia da Universidade Federal de Alfenas; Green, também brasileira, produzida por abelhas *Apis mellifera*, coletada no estado de Minas Gerais, região sudeste do Brasil, com origem botânica da *Baccharis dracunculifolia*. A amostra foi concedida em caráter de doação pela Prof^a. Ligia Bicudo, do Departamento de Ciências dos Alimentos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo; e Brown, produzida por abelhas *Apis mellifera* com origem botânica do *Lotus uliginosus* originada da “Región de La Araucanía”, Cunco, Chile. Concedida em caráter de doação por meio de colaboração com o Prof. Luis Navarrete Salazar, do Laboratório de Biologia Molecular e Farmacogenética, Departamento de Ciências Básicas, Faculdade de Medicina, Universidade de La Frontera (UFRO)-Chile.

3.2 Preparo das frações ricas em polifenóis

A extração dos polifenóis totais foi realizada segundo Silva *et al.* (2008). As amostras de própolis bruta foram maceradas e adicionadas, na proporção 1:3 (g/v), a etanol 80% (v/v). A extração foi realizada a 60 °C por 30 min, sob agitação constante. Em seguida, foi realizada a filtração em filtro de 22µm e centrifugação a 7500 x g, a 5°C, por 10 min. O sobrenadante foi transferido para um balão volumétrico e foi evaporado a baixa pressão em aparelho Rotaevaporador *RV 05 Basic 1-B IKA*. Após extração, os polifenóis totais das diferentes amostras foram ressuspensos em etanol P.A. a uma concentração de 100mg/mL. Assim, através de uma coluna *OASIS* (Walters, USA), realizou-se a retirada de eventuais resíduos de ceras, resinas e cristalização de açúcares presentes nas amostras de própolis bruta. Além disso, a coluna de afinidade foi utilizada com objetivo de concentrar os polifenóis totais nas amostras.

Foram adicionados à coluna sob sucção a vácuo, 1ml de Metanol, em seguida 1mL de água deionizada e posteriormente 1ml dos extratos. Ao final da filtração, adicionou-se à coluna 1mL de solução de metanol 5% (v/v) para a retirada de possíveis impurezas. Na etapa final, que consiste na eluição dos polifenóis totais retidos na coluna, foi injetado 1mL de Metanol (100% v/v) e o eluato da filtração foi recolhido em tubos de ensaio de 5 mL. As amostras foram evaporadas no rotaevaporador sob baixa pressão, sendo posteriormente ressuspensas com a adição de etanol (100% v/v) e diluídas nas devidas concentrações para realização dos ensaios descritos a seguir.

3.3 Análise quantitativa dos polifenóis totais

A quantificação de polifenóis totais das amostras foi realizada pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, utilizando-se ácido gálico como padrão. O método de Folin-Ciocalteu baseia-se na transferência de eletrons em meio alcalino de compostos fenólicos para os ácidos fosfotúngsticos/fosfomolibidênicos para a formação de complexos azuis determinados espectroscopicamente em 760 nm. (Ainsworth & Gillespie, 2007; Singleton *et al.*, 1999; Magalhães *et al.* 2006). A quantificação dos polifenóis totais das amostras foi realizada antes e depois da purificação com a coluna OAS/S para verificar o comprometimento do conteúdo das amostras.

3.4 Análise qualitativa por LC/MS dos polifenóis encontrados nas amostras de própolis

Após a quantificação dos polifenóis totais, as amostras foram caracterizadas para identificação dos principais compostos fenólicos presentes na própolis. A análise foi realizada em equipamento composto por um espectrômetro de massas tipo ion trap, modelo Esquire HCT (Bruker Daltonics, Alemanha), acoplado a um cromatógrafo líquido modelo Prominence (Shimadzu, Japão), composto por três bombas modelo LC-20AD, injetor automático SIL-20AC, forno para coluna CTO-20AC, controladora CBM-20A, e detector DAD (diode array) SPD-M20A. Para o acoplamento utilizou-se a fonte de eletrospray operada no modo negativo, monitorando-se os íons na faixa de 100 a 800 Da. O ensaio foi realizado utilizando-se coluna Luna C18(2) 250 x 4.6 mm com fluxo de

1.2 mL/min possuindo como fase móvel A: H₂O 0,1% ácido fórmico e B: MeOH 0,1% ácido fórmico.

3.5 Ensaio experimental *in vivo* utilizando camundongos LDLr^{-/-} suplementados com polifenóis da própolis

Este ensaio foi desenvolvido com a intenção de avaliar a influência dos polifenóis da própolis na modulação da expressão de genes envolvidos no processo de angiogênese presente na placa aterosclerótica. Em paralelo a este protocolo foi avaliado o potencial anti-aterogênico dos polifenóis da própolis em camundongos LDLr^{-/-}.

3.5.1 Animais

Foram utilizados 150 camundongos LDLr^{-/-}, machos, com idade média de três meses, oriundos de colônia do Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. A linhagem de camundongos LDLr^{-/-}, foi originada do Laboratório Jackson (Bar Harbor, ME, U.S.A).

Os animais foram mantidos em salas estéreis e termostatizadas do biotério (22±2°C), com água e ração ofertadas *ad libitum*, em ciclos alternados de claro/escuro, 12/12hs. Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, protocolo CEEA nº 170 e aprovado em 14/04/2008 por estar de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de

Experimentação Animal (COBEA).

3.5.2 Delineamento experimental

Para desenvolvimento do projeto, realizou-se dois protocolos experimentais já padronizados no Laboratório de Bioquímica Clínica do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, FCF-USP. O primeiro protocolo, denominado de Lesão Inicial (LI), visou avaliar a utilização dos polifenóis totais da própolis como agente preventivo à progressão da lesão aterosclerótica a partir do seu estado inicial. Assim, para o protocolo de LI, 75 animais (n=15/grupo) receberam durante 7 dias ração hipercolesterolêmica suplementada com 0,5% de colesterol e 0,5% de ácido cólico (Tabela 1), e nos 28 dias seguintes receberam os respectivos tratamentos através da técnica de gavagem, sem interromper o consumo de ração. Já o segundo protocolo, denominado de Lesão Avançada (LA), visou avaliar a influência dos polifenóis da própolis em lesões avançadas. Para tal, 75 animais (n=15 / grupo) receberam durante 12 semanas dieta hipercolesterolêmica suplementada com 0,5% de colesterol e 0,5% de ácido cólico e nas 4 semanas seguintes receberam os respectivos tratamentos, sem interromper o consumo de ração. Dados de consumo de ração (g) e massa corporal (g) foram aferidos semanalmente.

Tabela 1. Ingredientes adicionados para manipulação da ração experimental.

Ingredientes	%
Caseína	16,5
Amido de milho	43,45
Lipídio	20
Óleo de Coco	70,1
Óleo de Soja	29,9
Sacarose	10
Celulose	5
Mistura de Minerais*	3,5
Mistura de Vitaminas*	1
L-Cistina	0,3
Bitartarato de colina	0,25
Acido cólico	0,5
Colesterol	0,5

* adicionados segundo recomendação da AIN-93 (Reeves *et al.*, 1993).

3.5.3 Grupos experimentais

A suplementação com os polifenóis foi realizada diariamente, em período vespertino, sendo divididos nos seguintes grupos: Grupo Controle, recebendo solução salina 0.9%; Grupo Veículo, recebendo solução salina à 5% de etanol; Grupo Green Red e Brown (recebendo polifenóis das respectivas própolis a uma dose 250mg/kg/dia. O volume máximo da gavagem foi de 0,5 mL e as doses de polifenóis totais foram normalizadas de acordo com os resultados obtidos no ensaio de Folin-Ciocalteu. A dose escolhida para o desenvolvimento deste estudo teve como base trabalhos de toxicidade envolvendo própolis (Pereira *et al.*, 2008; Moura *et al.*, 2008; Barros *et al.*, 2008).

3.5.4 Análise bioquímica do perfil lipídico sérico

As análises séricas de triacilglicerol (TAG) , colesterol total (CT) e lipoproteína de alta densidade (HDL-C) foram realizados através de método enzimático/colorimétrico utilizando kit comercial (Labtest Diagnóstica, Minas Gerais, Brasil). Os resultados foram expressos em mg/dL. Calculou-se o valor da fração de colesterol não HDL (*non-HDL cholesterol*) através da subtração do valor de HDL-C do valor de colesterol total (Dorfman *et al.*, 2005).

Após os respectivos tempos de tratamentos, os animais foram previamente anestesiados com xilasina (2,0g/100mL; Bayer do Brasil) e cloridrato de cetamina (1,0g/10,0mL; Vetaset, Fort. Dodge Saúde Animal Ltda) e o sangue foi coletado por

punção cardíaca. As amostras de sangue foram, então, centrifugadas a 2000xg a 4°C durante 15 minutos para obtenção do soro. Este foi armazenado em *ependorfs* a -20°C para posterior análise.

3.5.5 Preparação dos tecidos para processamento

Depois de realizada a punção cardíaca, os animais (n=15/grupo) foram sacrificados por deslocamento cervical e o coração foi exposto e perfundido com salina 0,9%. A perfusão foi realizada via ventrículo esquerdo para retirada do excesso de sangue presente no tecido. Após esta etapa, o coração e a parte superior da aorta (arco aórtico) foram separados (n=15/grupo): parte das amostras (n=5/grupo) foi fixada em formalina 10% tamponada (pH 7,4) para análise da expressão de proteínas através da técnica de imunohistoquímica; uma segunda parte (n=5/grupo) foi seccionada imediatamente após a perfusão com salina para delimitação da área de lesão e acondicionados em tubos contendo solução de *RNAlater® Tissue Collection* (Qiagen, Torrance, CA, USA). Após 24 horas em temperatura ambiente, os tecidos foram retirados e acondicionados em criotubos, onde foram congelados em nitrogênio líquido para extração do RNAm; e por último, o grupo para análise morfométrica da área de lesão aterosclerótica (n=5/grupo). O coração e a parte superior da aorta (arco aórtico) foram removidos e mantidos em solução salina por uma hora para relaxamento da musculatura, e posteriormente deixados em formalina tamponada (10%, pH 7,4), por 48h, para fixação do tecido e posterior .

3.5.6 Preparação dos tecidos para os cortes histológicos

A inclusão dos tecidos para corte em lâminas foi realizada em três soluções de diferentes concentrações de gelatina. Primeiramente, solução a 5% de gelatina por três horas, depois a 10% por mais três horas e a 25% *overnight*. Todas as etapas foram realizadas em banho-maria (temperatura entre 40-50°C). Os ventrículos foram seccionados entre o ápice e a base num plano paralelo a uma linha definida pelas pontas laterais dos átrios. Os corações foram então embebidos no composto OCT dentro da câmara de congelamento do criostato (modelo JUNG FRIGOCUT 2800 N; Leica). Os cortes foram desprezados até a proximidade da região de interesse. Cortes consecutivos com 5 µm de espessura foram coletados em lâminas de microscópio cobertas com uma fina camada de gelatina. Os cortes compreenderam a região entre o sinus aórtico e o início da aorta com extensão média de 250-300 µm, conforme Paigen *et al.* (1987). Foram coletadas 8 lâminas, cada uma com 8 cortes, para cada animal. As referências anatômicas para a identificação do início da região de coleta são o formato arredondado da aorta e a presença de saliências em sua parede (constituem o início da formação das válvulas aórticas na raiz da aorta). O desaparecimento das válvulas indica o fim da região de coleta. As lâminas foram numeradas em série e coradas com *Oil red-O* e contra-coradas com hematoxilina e *light green*. Após a coloração, o material foi codificado e submetido à análise morfométrica.

3.5.7 Análise morfométrica

Os cortes foram analisados em microscópio óptico Zeiss acoplado a uma câmera Nikon DXM 1200C. A captura da imagem foi feita utilizando-se o *software* ACT1C for DXM1200C. O programa de análise de imagens *Axio Vision* foi utilizado para a obtenção das medidas. A área total de lesão foi calculada para cada animal e a área média para cada grupo foi estimada posteriormente em μm^2 . Todos os cortes histológicos obtidos foram avaliados com o objetivo de quantificar a área das lesões ateroscleróticas próximas às válvulas aórticas na raiz da aorta. O cálculo da lesão média/animal foi realizado somando-se todas as medidas (μm^2) dos cortes analisados, representando o valor real medido da lesão. Os valores médios por grupo foram utilizados para comparações estatísticas.

3.5.8 Extração do RNAm da área de lesão aterosclerótica

Como descrito anteriormente, parte dos animais de cada grupo (n=5/grupo) foi direcionada para as análises da expressão de RNAm de genes envolvidos no processo aterosclerótico e no processo angiogênico. Seguiu-se a homogeneização do tecido para posterior extração de RNAm utilizando o reagente TRIzol (Invitrogen, CA, USA), segundo o protocolo fornecido pelo fabricante, adicionando-se nitrogênio líquido ao cadinho juntamente com o tecido. Transferiu-se o macerado para tubo de vidro somando 1 mL de TRIzol. A mistura foi homogeneizada rapidamente em vortex e procedeu-se à extração do RNAm conforme indicação do fabricante. Após o término do

protocolo, as amostras de RNAm foram ressuspensas em 50µL de água tratada com dimetil pirocarbonato (DEPC) e realizou-se a quantificação de RNAm das amostras em equipamento Nanodrop (NanoDropTechnologies, Wilmington, DE, USA).

3.5.9 Construção do DNA complementar (cDNA)

Para construção do DNA complementar (cDNA) utilizou-se para cada 1µg de RNAm e 4µL de *High Capacity RNA-to-cDNA Kit* (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) água DEPC para volume final de 20µL. O preparo do cDNA foi realizado em termociclador *PX2 Thermal Cycler da Thermo Scientific* seguindo o seguinte protocolo: 5 min. a 25°C, seguido de 30 min. a 42°C e 5 min. a 85°C. Após o preparo, as amostras de cDNA foram armazenadas a -80°C.

3.5.10 Expressão gênica (RNAm)

Para este protocolo foi utilizada a reação de polimerase em cadeia em tempo real (*RT-qPCR*), utilizando cDNA, *Fast SYBR® Green Master Mix* (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany), água DEPC e os respectivos *primers forward* e *reverse*. As reações foram feitas no equipamento *7500 Fast Real Time PCR System* da *Applied Biosystems* (Singapura). Para a quantificação dos resultados utilizou-se o método comparativo C_t , também conhecido como $2^{-[\Delta\Delta C_t]}$ (Livack *et al.*, 2001), utilizando-se o gene ciclofilina como normalizador.

Tabela 2. Sequencia de *primers* utilizados para o ensaio com camundongos LDLr-/.

Gene	Primer Foward	Primer Reverse
Ciclofilina	5'-TGTGCTAACCGTTACCTGGCT-3'	5'-CAGTGCCACATACCAACTG-3'
INFg	5'-ATCTTCAAGCCATCCTGTGTGC-3'	5'-CAAGGCCCACAGGGATTTTC-3'
TGFb	5'-TGTGCTAACCGTTACCTGGCT-3'	5'-CAGTGCCACATACCAACTG-3'
IL-6	5'-TCGCCAGAGTGGTTATCTTTT-3'	5'-TAGTGAACCCGTTGATGTCC-3'
CD36	5'-TGTGTGAAGGTGCAGTTTTG-3'	5'-ATTTCTGTGTTGGCGCAGT-3'
HO-1	5'-CCCAAACGGACAAAGAGTT-3'	5'-TGGTCTCGATGGTATTCTGG-3'
MCP1	5'-GAACTTTGACAGCGACAAGAAG-3'	5'-CAGTGAAGCGGTACATAGGG-3'
VCAM	5'-ATCTTCAAGCCATCCTGTGTGC-3'	5'-CAAGGCCCACAGGGATTTTC-3'
ANG I	5'-TGTGCTAACCGTTACCTGGCT-3'	5'-CAGTGCCACATACCAACTG-3'
ANG II	5'-TCGCCAGAGTGGTTATCTTTT-3'	5'-TAGTGAACCCGTTGATGTCC-3'
VEGF	5'-TGTGTGAAGGTGCAGTTTTG-3'	5'-ATTTCTGTGTTGGCGCAGT-3'
MMP2	5'-CCCAAACGGACAAAGAGTT-3'	5'-TGGTCTCGATGGTATTCTGG-3'
MMP9	5'-GAACTTTGACAGCGACAAGAAG-3'	5'-CAGTGAAGCGGTACATAGGG-3'
FGF	5'-GCTGGCCCCAGCCGCTGGAG-3'	5'-GAGTGCAGGGTCAGCACTAC-3'
PDGF	5'-TGTGCTAACCGTTACCTGGCT-3'	5'-CAGTGCCACATACCAACTG-3'
TIMP 1	5'-TCGCCAGAGTGGTTATCTTTT-3'	5'-TAGTGAACCCGTTGATGTCC-3'

3.5.11 Expressão de moléculas de adesão PECAM-1 e VCAM-1

Após fixação em formalina 10% tamponada, os tecidos foram incluídos em parafina e emblocados para posteriormente serem seccionados com auxílio de micrótomo CUT 4050 (Microtec[®]), em cortes de 5 µm. Os cortes foram realizados na região dos ventrículos entre o ápice e a base num plano paralelo a uma linha definida pelas pontas laterais dos átrios. Com os cortes aderidos a lâminas histológicas, realizou-se o seguinte procedimento para desparafinização: 3 banhos de xilol (10 min cada), seguidos de 3 banhos em etanol 100%, 2 banhos em etanol 95% e 1 banho em etanol 70%. As lâminas foram lavadas várias vezes em água ultrapura. Após esta etapa foi realizada a recuperação do tecido com tampão de recuperação com 0,1% de Tween20 em panela Pascal (DakoCytomation- California/ Code N° S2800) conforme calibração do fabricante, por 2 minutos a 121°C com pressão de 15.9 psi. Após o término do programa, as cubas contendo as lâminas foram retiradas mantidas em temperatura ambiente (TA). Após 5 minutos, as lâminas foram lavadas em água ultrapura.

Para bloquear a ação de peroxidases endógenas, foram realizados 5 banhos de 6 minutos com peróxido de hidrogênio 20 vol. Após esta etapa, as lâminas foram lavadas em água ultrapura e secas em TA. Os cortes foram circundados com PAP PEN (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) e foi adicionado *Protein Block* (DakoCytomation- California/ Ref X0909para blo) queio de proteínas inespecíficas por 30 minutos a 37°C em câmara úmida, com consequente redução do *background*. Para a retirada do *Protein Block*, as lâminas foram invertidas e adicionou-se o anticorpo de interesse (monoclonal rat anti-PECAM, 1:400; policlonal coelho anti-VCAM, 1:400; Santa

Cruz Biotechnology, U.S.A) diluído em Diluidor de Background (DAKO, U.S.A) e incubado a 37°C em câmara úmida por 1 hora. Após este período, as lâminas foram lavadas em PBS em 5 banhos consecutivos em seguida realizou-se a incubação por 30 minutos TA com o polímero anti-primário e, por fim, a incubação com o segundo polímero. Após esta etapa, os cortes foram revelados com DAB 1:50 (DakoCytomation-California/ Code Nº K3468) e contracorados em hematoxilina de Harris.

3.6 Avaliação dos polifenóis das própolis no processo de angiogênese

3.6.1 Condições de cultura celular

Foram utilizadas duas linhagens de células endoteliais: *Human Umbilical Vein Endothelial Cells* (HUVEC) cultivadas em meio de cultura RPMI 1640 suplementado com bicarbonato de sódio 2,0 g/l, estreptomicina 100 µg/ml, penicilina 100 UI/ml e 10% de soro fetal bovino (SFB) inativado; e células EA.hy926 cultivadas em meio DMEM com 4.5 g/l glicose, suplementado com 2% HAT (100 µl hipoxantina, 0.4 µl aminopterina, and 16 µl timidina), 2 mM glutamina, 100 U/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomicina, 1 mM piruvato de sódio, e 10% SFB. As linhagens celulares de carcinoma renal (RCC4) e de células RCC4 com pVHL reintroduzido (RCC4/pVHL) foram cultivadas em meio de cultura semelhante ao meio das células EA.hy926 sem suplementação com HAT. As células tronco de camundongo da linhagem CGR8 (mES cells) foram cultivadas em frascos contendo base de 0.1% gelatina em meio GMEM. O meio de cultura foi suplementado com 9% SFB inativado, 2 mM L-glutamina (Biochrom, Berlin, Alemanha),

45 μM β -mercaptoetanol (Sigma Alderich) e 103 U/ml fator inibidor de leucemia (LIF) (Chemicon, Hampshire, UK). Todas as linhagens celulares utilizadas para este trabalho foram cultivadas em atmosfera umidificada com 5% de CO_2 a 37°C . Para exposição à hipóxia, células foram incubadas a 1,0% O_2 em hipóxia *workstation* (Ruskin Technology, Leeds, United Kingdom).

3.6.2 Viabilidade celular

Para o ensaio 1×10^4 células/*well* células foram plaqueadas em placa de 96 *wells* a um volume inicial de 200 μl . Após 3h de incubação a 37°C em atmosfera úmida de 5% de CO_2 , as células foram incubadas *overnight* com meio RPMI 1640 contendo 2% de SFB. Em seguida, após retirada do meio, 50 μl de meio RPMI 1640 com 10% de SFB contendo concentrações variadas (0,1-100 $\mu\text{g/ml}$) de polifenóis da própolis Green, Red e Brown foram adicionadas em cada *well*. A maior concentração equivalente do veículo (etanol) presente nos *wells* também foi testada, o que representou uma porcentagem de 0,1% v/v. Após 24h de incubação, o meio de cultura foi removido através de inversão da placa e 50 μl de uma solução de MTT 1 mg/ml em meio RPMI livre de vermelho de fenol foi adicionado e as placas foram agitadas por 3h a temperatura ambiente. Ao término deste tempo, o MTT não reduzido foi removido através de inversão da placa e 100 μl de dimetilsulfóxido (DMSO) foram adicionados em cada *well*. As placas foram vigorosamente agitadas, para completa solubilização do produto formazan e a densidade ótica de cada *well* foi determinada em leitor de Elisa a 570 nm de acordo com

Denizot & Lang (1986). Este ensaio também foi realizado com as células da linhagem EA.hy926 utilizando-se apenas a amostra Red.

3.6.3 Proliferação celular

Inicialmente, para análise da proliferação celular, foi utilizada a técnica de citometria de fluxo, baseada na marcação celular com diacetato de carboxi-fluoresceína, succinimidil ester (CFDA SE ou CFSE). Este fluoróforo (CFSE) penetra nas células por difusão passiva e seu grupo acetato é clivado pelas esterases intracelulares. O grupo succinimidil ester reage, então, com aminas celulares formando conjugados que são retidos nas células durante o desenvolvimento e a meiose. A marcação é herdada pelas células filhas após a divisão ou fusão celular e não é transferida para as células adjacentes.

O ensaio foi realizado no citometro de fluxo (FACs CANTO II BD®) do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF-USP com a colaboração da técnica Msc. Renata Albuquerque, sendo a análise dos dados realizada através do *software* Flow Jo versão 8.8.6.

Para realização do protocolo $2,5 \times 10^5$ células da linhagem HUVEC foram centrifugadas, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em PBS pré-aquecido (37°C). Foi adicionado CFSE 1 μ M e as células foram incubadas a 37°C por 30 min. Meio de cultura com 10% de SFB foi adicionado e as células foram novamente centrifugadas (esta etapa permite visualizar a formação de um *pellet* de célula de cor amarelada), ressuspensas em meio de cultura e incubadas a 37°C por 20

min. Após este tempo, as células foram finalmente centrifugadas, ressuspensas, plaqueadas (10^5 células/well) e incubadas a 37°C em atmosfera úmida de 5% de CO₂. Após a aderência das células, os tratamentos com os polifenóis das diferentes própolis (Green, Red e Brown) na concentração de 10 µg/mL foram adicionados, os meios foram enriquecidos com 2 e 10% de soro fetal bovino. Ao final de 16 h de tratamento, as células foram ressuspensas e levadas ao citometro de fluxo para avaliação da fluorescência.

Outro ensaio utilizado para avaliar a proliferação celular foi a incorporação da timidina tritiada (³H-timidina). Levou-se em consideração que a detecção de proliferação celular é facilmente reconhecida quando há presença de células em determinadas fases da mitose como, por exemplo, na metáfase, onde os cromossomos estão muito condensados. A replicação do DNA na maioria das células eucariotas ocorre somente durante o período de síntese (S) e esta etapa da intérfase não pode ser detectada por simples observação. As células podem ser reconhecidas, entretanto, através do fornecimento de moléculas que são incorporadas na nova molécula de DNA sintetizada, como por exemplo, a ³H-timidina.

A timidina, um nucleosídeo que é formado quando uma timina é ligada a um anel de desoxirribose, se ofertada às células em divisão, pode ser incorporada ao DNA durante a fase S do ciclo celular. Depois, através da autorradiografia, uma célula ou constituinte de uma célula (no caso, o DNA) é marcado pelo composto radioativo que depois é recoberto por uma emulsão fotográfica sensível a esta radiação (Alberts *et al.*, 2002).

Em média, 10^4 células da linhagem HUVEC foram adicionadas em cada um dos

96 poços, com meio de cultura RPMI 1640 contendo 10% de FBS, totalizando um volume final de 200 µL em cada poço, permanecendo nestas condições durante 6 horas até aderência total das células. Após este período foi adicionado meio de cultura RPMI com 1% de SFB por 16 h com o objetivo de sincronizar as células, encontrando-se todas no mesmo ciclo celular. As culturas foram mantidas a 37°C em atmosfera umidificada (95%) com 5 % de dióxido de carbono. Após a sincronização, as células foram incubadas com os respectivos tratamentos durante 24 h. Nas 16 horas finais do experimento foi adicionado ³H-timidina (Amersham Pharmacia Biotech) 1 µCi/poço (concentração final). O conteúdo de cada poço foi coletado e recuperado em um filtro de fibra de vidro. Após a adição do fluido de cintilação, a síntese do DNA incorporado-³H-timidina foi medida em oito replicatas usando um contador de cintilação automático (Packard BioScience Company) em meio líquido.

3.6.4 Migração celular

Para o ensaio de migração celular, 2×10^5 células endoteliais foram plaqueadas em placa de 48 *wells* com meio RPMI e 10% de SFB. Após as células apresentarem confluência de 80%, uma lesão na camada unicelular foi realizada com o auxílio de uma ponteira de 200µl. As células foram lavadas com PBS e adicionou-se meio RPMI 1640 sem soro fetal bovino, adicionado dos tratamentos, constituindo-se os seguintes grupos: Controle (meio RPMI 1640), Controle positivo (meio RPMI 1640 adicionado de VEGF 20ng/ml), Veículo (meio RPMI 1640 0,1% de etanol), Green (meio RPMI 1640 adicionado 20ng/ml de VEGF e 10 µg/ml de polifenóis da própolis verde), Red (meio

RPMI 1640 adicionado 20ng/mL de VEGF e 10 µg/ml de polifenóis da própolis vermelha) e Brown (meio RPMI 1640 adicionado 20 ng/ml de VEGF e 10 µg/ml de polifenóis da própolis Chilena). Após 16 horas, o número de núcleos celulares que atravessaram a linha demarcada foi quantificado em três campos microscópicos distintos representativos de *well*.

3.6.5 Ensaio *ex-vivo* de brotamento de anel de aorta

Para a análise dos efeitos das diferentes amostras de própolis na capacidade das células endoteliais se organizar e formar microcapilares, foi empregado o modelo *ex vivo* de cultura de anel de aorta de rato *Wistar* conforme descrito previamente (Nicósia & Ottinetti, 1990).

Primeiramente, as aortas torácicas foram removidas de ratos *Wistar* machos, de 2 a 3 meses de idade, previamente anestesiados com cetamina e xilasina e sacrificados por deslocamento servical. Em seguida, o tecido fibroadiposo peri-aórtico foi cuidadosamente removido, as aortas foram seccionadas em anéis com intervalos de aproximadamente de 1 mm. Os anéis passaram por cinco banhos consecutivos em meio de cultura MCDB131 estéril gelado, visando a retirada do excesso de sangue e materiais agregados ao tecido. Os anéis foram transferidos para uma placa de 48 *wells* (1 anel por *well*) contendo 0,1 ml de uma solução de colágeno de cauda de rato (1,5 mg/ml) já polimerizado. A solução de colágeno foi preparada através da mistura de 7,5 volumes de colágeno tipo I de cauda de rato (2 mg/ml), 1 volume de MEM 10x, 1,5 volume de NaHCO₃ e aproximadamente 0,1 volume de NaOH. Foi adicionado então, mais 0,1 ml da

solução de colágeno sobre o anel aórtico. Após completa polimerização da solução de colágeno 1,2 ml do meio MCDB131 suplementado com NaHCO_3 25 mM, 1% de L-glutamina, estreptomicina 100 $\mu\text{g/ml}$, penicilina 100 UI/ml e anfotericina 0,25 $\mu\text{g/ml}$, a preparação foi adicionada aos anéis de aorta juntamente com os seguintes tratamentos: Controle (MCDB131), Controle positivo (meio MCDB131 de VEGF 20 $\mu\text{g/ml}$), Veículo (meio MCDB131 0,1% de etanol), Green (meio MCDB131 adicionado de VEGF 20 $\mu\text{g/ml}$ e 10 $\mu\text{g/ml}$ de polifenóis da própolis Green), Red (meio MCDB131 adicionado de VEGF 2 $\mu\text{g/ml}$ e 10 $\mu\text{g/ml}$ de polifenóis da própolis Red) e Brown (meio MCDB131 adicionado de VEGF 20 $\mu\text{g/ml}$ e 10 $\mu\text{g/ml}$ de polifenóis da própolis Brown). As culturas foram mantidas a 37°C em atmosfera úmida de 5% de CO_2 durante 6 dias. No sexto dia, imagens das culturas de anéis de aorta foram capturadas em microscópio invertido com sistema de imagem acoplado. A análise de imagem foi realizada com auxílio do programa *AxioVision* 4.5, onde os brotamentos provenientes dos anéis de aorta foram contados e seus comprimentos quantificados.

3.6.6 Membrana Corioalantóica de Embrião de Galinha (CAM)

Após caracterização *in vitro* e *ex vivo* do potencial anti-angiogênico dos polifenóis das diferentes própolis, foi realizado o protocolo da Membrana Corioalantóica de Embrião de galinha (CAM) para caracterização do evento anti-angiogênico *in vivo*. Para tal, ovos embrionados de galinha foram incubados em chocadeira, a 37°C e 65% de umidade relativa. No terceiro dia de experimento, um orifício foi aberto na casca dos ovos contendo os embriões, em fluxo laminar estéril, retirando-se 2-3 ml de albumina

com auxílio de uma seringa estéril. Em seguida, esta “janela” foi fechada com fita adesiva e os embriões foram incubados a 37°C e 65% de umidade relativa até o 8º dia de idade, quando foram tratados com as seguintes soluções embebidas em discos de papel de filtro nº 1 (Whatman): Controle (solução de Ring), Controle positivo (solução de Ring adicionado de EGF 2 µg/ml), Veículo (meio Ring 0,1% de etanol), Green (solução de Ring adicionado 2 µg/ml de EGF e 10 µg/ml de polifenóis da própolis verde), Red (solução de Ring adicionado 2 µg/ml de EGF e 10 µg/ml de polifenóis da própolis vermelha) e Brown (solução de Ring adicionado 2 µg/ml de EGF e 10 µg/ml de polifenóis da própolis Chilena). As soluções foram adicionadas aos papéis de filtro com volume de 10 µl nos dias subsequentes (9º e 10º). No 11º dia de incubação dos embriões, foi realizada a fixação das membranas corioalantóicas dos embriões de galinha (CAMs) com para-formaldeído 10%, retirando-se os papéis de filtro juntamente com a CAM contida abaixo do mesmo. O material obtido foi lavado com PBS gelado e colocado de modo invertido em uma placa de cultura contendo PBS para exposição do tecido contido abaixo do filtro. A aquisição das imagens foi realizada com o auxílio de câmera fotográfica (Câmera DS-u1) acoplada à lupa estereoscópica (Lupa Nikon SMZ1800) e do programa de captação de imagens ACT-2U. A análise das imagens obtidas foi realizada com o auxílio do programa AxioVision 4.5.

3.6.7 Ensaio de autodiferenciação de *stem cells* em células CD31 positivas

Como a diferenciação de células precursoras em células endoteliais desempenha um papel crucial no desenvolvimento de novos vasos sanguíneos, o próximo passo foi avaliar o impacto apenas dos polifenóis da própolis Red (PRP) na diferenciação de *embryonic bodies* (EBs) às células CD31 positivas. Os EBs foram gerados usando 1000 células/35 µl de meio através da técnica de *hanging drops*. As células contidas nas gotas foram cultivadas em placas de 10 cm por 2 dias sem adição de LIF (Wermo *et al.*, 2010). Após este período os EBs (15 por placa) foram cultivados em placas Lumox (Greiner Bio-one, Frickenhausen, Germany) por mais 2 dias até haver aderência completa dos EBs e assim iniciou-se o tratamento por mais 5 dias consecutivos. O PRP foi diluído em meio de cultura na concentração de 10 µg/ml; para o controle foi adicionado meio de cultura com 0,1% de etanol.

Seguido o tempo de tratamento, os EBs foram lavados com PBS e fixados com etanol P.A. -20°C por um dia. Após fixação, os EBs foram novamente lavados com 0.1% Triton-PBS e para bloquear ligações inespecíficas foram incubados durante 1h em TA com 10% de SFB em 0.01% Triton-PBS. Adicionou-se anticorpo anti-CD31 e incubou-se por 16h. EBs foram então lavados 4 vezes com 0.01% Triton-PBS e incubados com anticorpo anti-rat-cy3 1 h em TA. DAPI foi adicionado nos últimos 20 minutos de incubação para coloração dos núcleos. Depois de lavar 3 vezes com 0.01% Triton-PBS EBs foram montados em lâminas de vidro e a fluorescência foi analisada em um Laser Scanning System LSM 510 META (Configuration 30 Meta Zen 2007). Áreas positivas para expressão de CD31-foram quantificadas utilizando o software Zeiss ZEN.

3.6.8 Ensaio com *SuperArray*

Foi realizado o ensaio com o *SuperArray* (*SAbioscience*®), avaliando-se a expressão de 84 genes envolvidos no processo de angiogênese (Tabela 6, Anexo). A utilização do *SuperArray* permitiu, de uma forma geral, a visualização da influência dos polifenóis nos principais genes envolvidos no processo de angiogênese, possibilitando, em parte, o esclarecimento de quais genes (RNAm) envolvidos na angiogênese são modulados em células HUVECs pelos polifenóis das diferentes própolis.

3.6.9 *Western blot*

Nos experimentos que envolveram a técnica de *Western blot*, 1×10^5 células foram incubadas em placas de 60 cm², e após atingirem confluência de 80-90%, as células foram tratadas sob diferentes condições experimentais. Após o período de tratamento, foram lavadas rapidamente com PBS gelado e lisadas com 50 µl de tampão de lise a base de uréia 6.65M (uréia 6.65M/ glicerol 10%/ SDS 1%/ Tris 10 mM pH 6.8). O lisado foi recolhido em tubos *eppendorf* de 1.5mL, sendo sonicadas com 20 pulsos em sonificador *Sonifier 250* (BRASON, Danbury, USA), centrifugadas (16000xg, 5 min, 4°C). Utilizando o sobrenadante, a concentração de proteínas foi determinada através do kit BCA. Em seguida, 100 µg de proteína total foi adicionado ao tampão de amostra SDS-PAGE (Tris 0.1M pH 6.8, SDS 4%, β-mercaptoetanol, azul de bromofenol 0.2%, glicerol

2%) e aquecida a 95° C por 5 min. As amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida 10% contendo SDS e foram submetidas ao campo elétrico – 50min a 120 V. Após a corrida eletroforética, as proteínas do gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose utilizando um sistema de transferência semi-seco (BioRad, Germany) – 90 min a 0.075A/membrana. Sítios de ligação inespecíficos da membrana foram bloqueados com solução de leite 3% em TBS-T por 1h à temperatura ambiente. Os respectivos anticorpos (anti-HIF-1 α , 1:1000 em 3% de leite/TBS-T; anti-pVHL; anti-Cdc42; anti- α -tubulin) foram adicionados e incubados *overnight* a 4°C sob agitação suave. Após este período, as membranas foram lavadas 3X em PBS. Assim, o anticorpo secundário anti-mouse conjugado à peroxidase (1:2000 em 3% de leite/TBS-T) foi incubado por 1h, e sequencialmente as membranas foram lavadas 3X com TBS-T, seguida de detecção realizada pelo método de quimioluminescência utilizando-se o kit ECL™ (GE Healthcare), conforme especificações sugeridas pelo fabricante.

3.7 Análise da secreção de VEGF

O VEGF é um dos principais genes reguladores do processo angiogênico. Para verificar a influência dos polifenóis na produção/secreção de VEGF, utilizamos o kit comercial QuantiGlo chemiluminescent ELISAs utilizando as informações do próprio fabricante. As CE's foram tratadas com PRP sob hipóxia (1% de oxigênio) e após uma cinética (4, 8, 12, 24 h), o sobrenadante foi recolhido para quantificação de VEGF secretado e o RNAm extraído para avaliação da expressão gênica.

3.8 Análise estatística

Os resultados estão apresentados na forma de média $\pm$ desvio padrão (DP). Dada a não distribuição normal dos dados, utilizou-se o teste não paramétrico Kruskal-Wallis através do Software SSPS versão 11.0 para MAC, com o nível de significância de $p \leq 0,05$. Todos os experimentos foram realizados no mínimo em triplicata e repetidos por pelo menos três vezes.

4. RESULTADOS

4.1 Polifenóis totais e perfil de compostos polifenólicos

O percentual de polifenóis totais encontrados nas diferentes amostras de própolis foi em média de 32%, não havendo diferença entre as própolis analisadas. Entretanto, observou-se que o tratamento das amostras com a coluna de afinidade OAS/S aumentou a concentração de polifenóis totais de todas as amostras (Tabela 03).

Tabela 03. Concentração de polifenóis totais nas amostras de própolis Green, Red e Brown.

Amostras	Concentração de Polifenóis totais (%)	
	Extrato bruto	Extrato purificado*
Green	23,7±1,9	31,5±2,6
Red	20,5±2,3	30,6±2,9
Brown	19,98±2,7	34,4±1,7

Resultados representam a média de três determinações, sendo expressos na forma média $\pm$ DP. Os resultados foram obtidos na forma de equivalente de ácido gálico/mg de amostra e apresentados na forma de porcentagem (%). *Purificação realizada através de coluna OAS/S.

Após a quantificação dos polifenóis totais, as amostras foram analisadas para identificação dos compostos fenólicos nas frações ricas em polifenóis das própolis. Observamos que, apesar das amostras possuírem conteúdo semelhante de polifenóis totais, a composição dos mesmos é diferente entre as própolis. Fato que fica evidenciado quando analisamos a Figura 04.

Figura 04. Cromatogramas das amostras de própolis Green, Red e Brown. 1, ácido cafeíco; 2, resveratrol; 3, quercetina; 4, apigenina; 5, pinocembrina; 6, galangina; 7, ácido cafeico fenil éster. As condições cromatográficas estão descritas a seguir: coluna RP-18 e eluição com gradiente de solventes (A: água/ácido fórmico 19:1, v/v e B: metanol) da seguinte forma: 30% metanol (15 min), 40% (aos 20 minutos), 45% (aos 30 min), e 60% (aos 50 min), com fluxo de 1 ml/min.

4.2 Influência da suplementação de polifenóis extraídos da própolis em camundongos LDLr^{-/-}

4.2.1 Evolução ponderal e consumo de ração

Na Figura 05 está demonstrada a evolução ponderal dos animais submetidos aos diferentes protocolos experimentais (LI e LA). Tanto no protocolo de lesão inicial (Figura 5A), quanto no de lesão avançada (figura 5B) não houve diferença significativa entre os grupos. No entanto, observou-se, em ambos os protocolos, uma tendência na redução da massa corporal após o início da suplementação diária. O consumo médio de ração (0,09 g de ração/g de massa corporal/dia) foi semelhante durante todo o ensaio independente do grupo experimental.

Figura 05. Evolução ponderal dos animais suplementados com polifenóis das diferentes própolis: Green, Red e Brown (250 mg/Kg/dia). Camundongos nocaute para o gene do receptor de LDL (LDLr^{-/-}; n=15/grupo) receberam ração hipercolesterolêmica enriquecida com 0,5% de colesterol e ácido cólico e foram submetidos aos protocolos de **A**) lesão inicial (LI, início do tratamento: 2ª semana após o início da dieta) e **B**) lesão avançada (LA, início do tratamento: 12ª semana após o início da ração hipercolesterolêmica) com seus respectivos tratamentos.

4.2.2 Influência da suplementação com polifenóis da própolis no perfil bioquímico dos animais LDLr-/-

Como observado na Tabela 04, os animais submetidos ao protocolo de LI que foram suplementados com os polifenóis da própolis Red, obtiveram melhor perfil bioquímico, com redução significativa ($p < 0,05$) dos níveis séricos de TAG, CT e *non-HDL-C*. Os grupos Green, Red e Brown apresentaram aumento ($p < 0,05$) nas concentrações de HDL-C, sendo o Red superior ($p < 0,01$) ao Green e Brown. Em contraste, no protocolo de LA, apenas o grupo Red apresentou alterações benéficas no perfil lipídico ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle para as variáveis TAG, CT e HDL-C.

Tabela 04. Perfil bioquímico (Triacilglicerol, colesterol total, HDL-C, non-HDL colesterol) dos grupos experimentais submetidos aos protocolos de Lesão Inicial (LI) e lesão Avançada (LA).

<i>Protocolos experimentais</i>										
	<i>Lesão Inicial (grupos)</i>					<i>Lesão Avançada (grupos)</i>				
	Controle	Veículo	Green	Red	Brown	Controle	Veículo	Green	Red	Brown
(mg/dL)	(n=13)	(n=12)	(n=14)	(n=15)	(n=11)	(n=13)	(n=13)	(n=10)	(n=11)	(n=12)
Triacilglicerol	478±139	450±48	363±79	266±60 ^a	347±51	456±69	377± 96	275,5± 22	211,1± 55 ^a	305± 29
Colesterol total	1942±139	2048±89	2096±60	1620±81 ^a	2084±68	1920±158	2271± 253	2030± 55	1750± 64 ^a	2069± 119
HDL-C	25±5	24±3	37±5 ^b	42±8 ^a	36±2 ^b	26± 5	26± 6	22,10± 3	34,11± 5 ^a	20,63± 1
Non-HDL-C	1917±141	2025±201	2072±198	1585±172 ^a	2055±201	1873± 169	2244± 252	1908± 56	1816± 67	2049± 119

Perffil lipídico (triacilglicerol; colesterol total; HDL-C, high density lipoprotein; nonHDL-C, non HDL colesterol) dos animais tratados (250mg/kg/dia) com os polifenóis das distintas amostras de própolis (Green, Red, Brown) submetidos ao protocolo de lesão inicial (LI) e lesão avançada (LA). Os resultados estão apresentados na forma de média e desvio padrão. Letras distintas em uma linha dentro de um mesmo grupo denota significância estatística (p<0,05).

4.2.3 Influência da suplementação com polifenóis das diferentes própolis no desenvolvimento da área de lesão aterosclerótica

O desenvolvimento dos protocolos LI e LA permitiu observar a influência do consumo diário de polifenóis de diferentes própolis na prevenção e no desenvolvimento de lesões ateroscleróticas em diferentes estágios de sua progressão (Figura 6). Observamos que, quando oferecidos no início da instalação da lesão (protocolo LI, Figura 6A), os polifenóis das diferentes própolis reduziram ($p < 0.05$) a progressão da lesão em relação ao grupo controle (Green, $726\mu\text{m}^2$; Red, $519\mu\text{m}^2$; Brown, $698\mu\text{m}^2$; Controle, $1184\mu\text{m}^2$). Entretanto, os polifenóis da própolis Red apresentaram maior potencial ateroprotetor, com menor área de lesão, em relação aos outros grupos, Green e Brown. No protocolo LA (Figura 6B) também houve redução na progressão da lesão aterosclerótica quando comparamos os grupos que receberam tratamento com os polifenóis em relação ao GC; entretanto, apenas os polifenóis da própolis Red ($1082\mu\text{m}^2$) foram capazes de impedir a progressão significativa ($p < 0,05$) da área de lesão em relação ao GC ($1598\mu\text{m}^2$).

Figura 06. Análise da área (μm^2) das lesões ateroscleróticas da raiz da aorta dos camundongos $\text{LDLr}^{-/-}$ ($n=5/\text{grupo}$) submetidos à dieta hipercolesterolêmica no protocolo de lesão Inicial (LI) e Lesão Avançada (LA). Todos os animais receberam tratamento diário por gavagem durante 28 dias (250mg/kg/dia). **A) Imagem de cortes na área de lesão (aumento de 100X). **B)** Gráfico representativo das áreas de lesão LI. Os dados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão. **C)** Imagem de cortes na área de lesão (aumento de 100X). **D)** Gráfico representativo das áreas de lesão LA. Os dados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão. * significância estatística ao nível de $p<0,05$ e ** $p<0,01$, quando comparados ao grupo controle.**

4.2.4 Avaliação da expressão gênica (RNAm) na área de lesão aterosclerótica nos diferentes protocolos experimentais

A Figura 07 apresenta os resultados da análise de expressão de alguns genes envolvidos no processo de formação e progressão da placa de ateroma em corações de camundongos LDLr^{-/-} submetidos ao protocolo LI. Observou-se que todos os tratamentos à base de polifenóis da própolis reduziram ($p < 0,05$) a expressão de RNAm de MCP-1, INFg, TGFb e INFg. Houve ainda redução na expressão (RNAm) de IL-6 e CD36, entretanto, em ambos os genes houve uma redução significativa ($p < 0,05$) no grupo Red em relação aos grupos Green e Brown. Os grupos experimentais apresentaram ainda aumento da expressão de hemeoxigenase-1 (HO-1) em relação ao grupo controle.

A Figura 08 representa os resultados da análise de expressão dos genes avaliados no protocolo LI, agora avaliados no protocolo LA. Foi observada redução na expressão de MCP1, INFg, IL-6 em todos os grupos suplementados com as diferentes própolis. Entretanto, apenas o tratamento com os polifenóis da própolis Red foi capaz de reduzir a expressão de CD36, que é um importante marcador do processo aterosclerótico. Houve ainda aumento da expressão de HO-1, sendo esta estatisticamente superior para todos os grupos experimentais em relação ao controle ($p < 0,05$) para o grupo Red em relação aos grupos Green e Brown.

Após a análise de expressão de genes (RNAm) regulatórios do processo aterosclerótico, o próximo passo foi avaliar a influência da suplementação diária com os polifenóis na modulação de genes envolvidos na angiogênese em ambos os protocolos experimentais. Para a realização desta etapa do projeto utilizou-se as mesmas replicatas das amostras de cDNA expressas para os genes envolvidos na aterosclerose. Na Figura 09 observa-se que, no protocolo LI, os polifenóis dos três extratos de própolis,

diminuíram a expressão gênica de angiopoietina I e II, FGF, VEGF, PDGF, MMP-9 e PECAM e aumentaram a expressão de TIMP-1. No entanto, no protocolo de LA, observou-se que os polifenóis das própolis Green, Red e Brown inibiram a expressão gênica de PDGF, VEGF, MMP-9 e PECAM, mas apenas os polifenóis da própolis Red aumentaram a expressão gênica de TIMP-1 (Figura 10).

Figura 07. Expressão relativa (U.A.) de genes envolvidos no processo de formação e progressão da placa de ateroma em camundongos $LDLr^{-/-}$, submetidos ao protocolo de lesão inicial (LI). Grupo Controle, recebendo solução salina 0.9%; Grupo Veículo, recebendo solução salina a 5% de etanol; Grupo Green (recebendo polifenóis da própolis green a uma dose de 250mg/kg/dia), Grupo Red (recebendo polifenóis da própolis red a uma dose de 250mg/kg/dia), Grupo Brown (recebendo polifenóis da própolis brown a uma dose de 250mg/kg/dia); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Figura 08. Expressão relativa (U.A.) de genes envolvidos no processo de formação e progressão da placa de ateroma em camundongos LDLr^{-/-}, submetidos ao protocolo de lesão avançada (LA). Grupo Controle, recebendo solução salina 0.9%; Grupo Veículo, recebendo solução salina a 5% de etanol; Grupo Green (recebendo polifenóis da própolis green a uma dose de 250mg/kg/dia), Grupo Red (recebendo polifenóis da própolis red a uma dose de 250mg/kg/dia), Grupo Brown (recebendo polifenóis da própolis brown a uma dose de 250mg/kg/dia). *p<0,05; **p<0,01.

Figura 09. Expressão relativa (U.A.) de genes envolvidos no processo angiogênico na placa de ateroma de camundongos $LDLr^{-/-}$, submetidos ao protocolo de lesão avançada (LI). Grupo Controle, recebendo solução salina 0.9%; Grupo Veículo, recebendo solução salina a 5% de etanol; Grupo Green (recebendo polifenóis da própolis green a uma dose de 250mg/kg/dia), Grupo Red (recebendo polifenóis da própolis red a uma dose de 250mg/kg/dia), Grupo Brown (recebendo polifenóis da própolis brown a uma dose de 250mg/kg/dia). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Figura 10. Expressão relativa (U.A.) de genes envolvidos no processo angiogênico na placa de ateroma em camundongos $LDLr^{-/-}$, submetidos ao protocolo de lesão avançada (LI). Grupo Controle, recebendo solução salina 0.9%; Grupo Veículo, recebendo solução salina a 5% de etanol; Grupo Green (recebendo polifenóis da própolis green a uma dose de 250mg/kg/dia), Grupo Red (recebendo polifenóis da própolis red a uma dose de 250mg/kg/dia), Grupo Brown (recebendo polifenóis da própolis brown a uma dose de 250mg/kg/dia). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Em relação à expressão de proteínas de moléculas de adesão, PECAM-1 e VCAM-1 (Figura 11), observamos resultados condizentes com a expressão de RNAm, sendo a expressão de PECAM-1 e VCAM-1 reduzidas em todos os grupos do protocolo LI. No protocolo LA, a expressão de PECAM-1 também foi reduzida em todos os grupos e a expressão de VCAM-1 foi diminuída apenas nos grupos Red e Brown.

Figura 11. Expressão das moléculas de adesão PECAM e VCAM em lesão aterosclerótica de camundongos deficientes para receptores de LDLr^{-/-} nos protocolos de LI e LA. Grupo Controle (aumento de 40X), recebendo solução salina 0.9%; Grupo Veículo (aumento de 20X), recebendo solução salina a 5% de etanol; Grupo Green(aumento de 20X), recebendo polifenóis da própolis green a uma dose de 250mg/kg/dia, Grupo Red (aumento de 20X), recebendo polifenóis da própolis red a uma dose de 250mg/kg/dia, Grupo Brown (aumento de 20X), recebendo polifenóis da própolis brown a uma dose de 250mg/kg/dia.

Após caracterizar os efeitos antiateroscleróticos e antiangiogênicos no modelo *in vivo* com o camundongo LDL^{-/-}, o próximo passo deste trabalho foi elucidar a influência e o mecanismo de ação dos polifenóis no processo angiogênico a partir de modelos experimentais específicos utilizados para o estudo deste processo.

4.3 Influência dos polifenóis da própolis na viabilidade de células endoteliais

O efeito dos diferentes polifenóis sobre a viabilidade de células endoteliais está apresentado na Figura 12. A incubação de células HUVEC por 24h com concentrações diversas (0,1 – 100 µg/ml) demonstrou que, a partir da concentração de 10 µg/ml, há redução da viabilidade celular, provocando queda da função celular em relação ao grupo controle (Figura 12A). O mesmo experimento foi repetido com células endoteliais da linhagem EAhy.926 (Figura 12B). Com base nesses resultados adotou-se que a concentração máxima utilizada para realização dos experimentos seria de 10 µg/ml.

Figura 12. Influência dos diferentes polifenóis na viabilidade de células endoteliais incubadas por 24h com distintas concentrações (0,1-100 µg/mL) de polifenóis totais das diferentes própolis. Viabilidade de células endoteliais (A, HUVEC; B, EA.hy926) sob diversas concentrações de polifenóis das diferentes própolis. A concentração máxima do veículo, etanol (0,1% v/v) também foi testada. Os resultados estão apresentados na forma de média $\pm$ DP (n=24).

4.4 Proliferação celular

De acordo com o resultado de proliferação celular, utilizando a técnica de citometria de fluxo (Figura 13), foi possível observar que em meio contendo 2% de SFB houve redução significativa ($p < 0,05$) da proliferação celular do grupo Red em relação aos outros grupos experimentais. O grupo Brown também apresentou redução significativa em relação ao grupo Controle e Green, sendo estes últimos semelhantes. O mesmo perfil foi encontrado quando avaliamos o processo de proliferação celular com o meio

suplementado com 10% de SFB.

Figura 13. Proliferação de células HUVEC tratadas com os polifenóis das diferentes própolis utilizando a técnica de citometria de fluxo e CFSE como fluoróforo. Histograma da intensidade de fluorescência da marcação de células HUVEC com CFSE na concentração de 1 μ M adicionado dos tratamentos com os polifenóis Green, Red e Brown na concentração de 10 μ g/mL com tempo de incubação de 16h. **A)** Meio enriquecido com 2% de SFB; **B)** Meio enriquecido com 10% de SFB.

Apesar dos resultados apresentados anteriormente serem condizentes com dados da literatura, em sua grande maioria, as moléculas anti-angiogênicas influenciam todas as etapas do processo angiogênico, incluindo a proliferação celular. Decidimos, então, realizar um experimento comparativo para confirmar o maior potencial antiproliferativo do grupo Red. Ademais, anteriormente, no processo de padronização dos experimentos, os polifenóis totais de todos os grupos experimentais demonstraram atividade anti-angiogênica semelhante. Desse modo, decidiu-se reavaliar esta metodologia e compará-

la com o ensaio de incorporação de [^3H]Timidina para confirmação destes resultados (Figura 14).

Com o resultado da incorporação de timidina tritiada em células HUVEC, observamos que os polifenóis das própolis Red e Brown são potentes inibidores da proliferação celular quando comparados aos outros grupos experimentais, bloqueando a proliferação celular entre 45% e 38%, respectivamente, quando comparados ao GC.

Figura 14. Proliferação de células HUVEC tratadas com os polifenóis das diferentes própolis utilizando a técnica de incorporação de timidina tritiada. As células foram incubadas durante 24h com seus respectivos tratamentos; nas 16h finais do experimento adicionou-se 1µCi/poço de [³H]-timidina; *, **, *** indicam significância estatística (p<0,05) em relação ao GC.

Após este ensaio, foi confirmado que em todos os grupos experimentais observou-se inibição da proliferação das células HUVEC, mesmo quando incubadas com fatores proliferativos (fitohemaglutinina e SFB 10%). Confirmou-se, ainda, o maior potencial anti-proliferativo do grupo Red em relação aos outros grupos, independente da metodologia utilizada.

4.5 Polifenóis da própolis inibem a migração de células endoteliais

Neste ensaio foi avaliada a capacidade de migração das células endoteliais (HUVEC e EA.hy926; Figura 15) na presença do fator pro-angiogênico VEGF e dos polifenóis das diferentes própolis. Nas duas linhagens de células endoteliais foi observado padrão de migração semelhante, sendo que a migração dos grupos tratados com polifenóis da própolis foi reduzida em média 45% quando comparamos ao grupo controle. Esta inibição fica mais expressiva quando comparamos os grupos tratados com polifenóis ao grupo tratado com VEGF (20 ng/ml). Vale ressaltar ainda, que mesmo na presença deste fator estimulatório (VEGF + polifenóis), os polifenóis inibiram a migração das células endoteliais independente da linhagem.

Figura 15. Efeito do tratamento com polifenóis da própolis sobre a migração celular de células endoteliais (HUVEC e EA.hy926). As figuras são representativas dos seguintes grupos: grupo controle; Veículo (etanol 0,1% v/v); controle positivo (VEGF 20 ug/ml); Green (10 µg/ml + VEGF 20 ng/ml), Red (10 µg/ml + VEGF 20 ng/ml); Brown (10 µg/ml + VEGF 20 ng/mL). As fotos foram tiradas 16 h após a incubação das células com os diferentes tratamentos; objetiva de 5X. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

4.6 Polifenóis da própolis inibem a organização de células endoteliais para a formação de microvasos

Os resultados da figura 16 demonstram que os polifenóis das própolis foram capazes de inibir a formação de tubos em anéis de aorta de rato *Wistar*, quando comparados ao grupo controle. Este resultado é bem evidenciado quando comparado ao grupo controle positivo e levando-se em consideração que os anéis tratados também sofreram estímulo com este indutor do processo de angiogênese, fato que sugere um importante papel inibitório dos polifenóis da própolis no processo angiogênico.

Figura 16. Influência dos tratamentos com polifenóis no brotamento de novos vasos em anéis de aorta. Os anéis são representativos de: Controle (MCDB131), Controle positivo (meio MCDB131 de VEGF 20ug/ml), Veículo (meio MCDB131 0,1% de etanol), Green (meio MCDB131 adicionado de VEGF 20ug/ml e 10 µg/ml de polifenóis da própolis verde), Red (meio MCDB131 adicionado de VEGF 20ug/ml e 10 µg/ml de polifenóis da própolis vermelha), Brown (meio MCDB131 adicionado de VEGF 20ug/ml e 10 µg/ml de polifenóis da própolis Chilena); Gráfico representativo dos resultados do brotamento.

4.7 Polifenóis da própolis inibem a formação de novos vasos

Como apresentado na Figura 17, os grupos experimentais que sofreram tratamentos com os polifenóis das diferentes própolis mostraram-se com menor vascularização em relação ao grupo controle, mesmo sendo estimulados com Fator de Crescimento Epidermal (EGF, fator pró-angiogênico) utilizado como controle positivo do ensaio. Além disso, o grupo Red apresentou menor brotamento de novos vasos em relação aos grupos Green e Brown, sugerindo uma ação mais efetiva dos polifenóis da própolis vermelha em relação aos outros tipos.

Figura 17. Influência dos polifenóis da própolis na angiogênese da Membrana Coreoalantóica do Embrião de galinha (CAM). Após implantação do filtro, os embriões receberam os seguintes tratamentos durante 2 dias consecutivos. A) Controle (solução de Ring), Controle positivo (solução de Ring adicionado de EGF 2ug/ml), Veículo (meio Ring 0,1% de etanol), Green (solução de Ring adicionado de EGF 2ug/ml e 10 µg/ml de polifenóis da própolis verde), Red (solução de Ring adicionado de EGF 2ug/ml e 10 µg/ml de polifenóis da própolis vermelha) e Brown (solução de Ring adicionado de EGF 2ug/ml e 10 µg/ml de polifenóis da própolis Chilena). **A)** Imagem representativa das membranas; **B)** Gráfico representativo dos resultados da formação de novos vasos. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

4.8 Modulação da expressão de genes alvo envolvidos na angiogênese por polifenóis da própolis

Após a realização dos ensaios *in vivo*, *in vitro* e *ex vivo*, que caracterizaram o potencial anti-angiogênico dos polifenóis das diferentes própolis, o próximo passo deste trabalho foi avaliar de que forma estes polifenóis influenciam a expressão de genes alvo do processo angiogênico, para elucidar a ação destes compostos no processo de formação de novos vasos. Para este ensaio foi utilizado *SuperArray* (SAbioscience®), avaliando-se a expressão de 84 genes envolvidos no processo de angiogênese (Anexo 1). A utilização do *SuperArray* permitiu, de uma forma geral, a visualização da influência dos polifenóis nos principais genes envolvidos no processo de angiogênese, possibilitando, em parte, o esclarecimento de quais genes envolvidos na angiogênese são modulados em células endoteliais humanas pelos polifenóis das diferentes própolis. Para este ensaio foi realizado uma cinética de expressão gênica com o principal gene modulador do processo angiogênico, VEGF. A cinética para este gene visou otimizar o uso do Array no tempo de tratamento em que a ação do VEGF está potencializada na célula endotelial.

A cinética consistiu em avaliar a expressão gênica de VEGF de células tratadas com os polifenóis nos seguintes tempos: 2, 4, 8, 16 h (Figura 18). Observamos que a partir de 4 h, a expressão de VEGF é significativamente reduzida em todos os grupos tratados com polifenóis da própolis. Portanto, o tempo escolhido para realização do Array foi de 4 h de tratamento.

Figura 18. Cinética de expressão de RNAm VEGF nos tempos 2, 4, 8, 16 horas. Após realização do ensaio de cinética de expressão do gene VEGF, decidimos usar o tempo de 4 horas para incubação das células com os respectivos tratamentos.

Observamos, na figura 19A, que o veículo (etanol 0,1% v/v) não influenciou a expressão gênica em relação ao controle. Entretanto, os polifenóis dos diferentes grupos influenciaram a expressão gênica (RNAm) de maneira distinta. O grupo Green (figura 19B) apresentou pouca variação na expressão dos referidos genes em relação ao GC. Entretanto, no grupo Red (figura 19C), cerca de 80% dos genes estudados apresentaram modificações na sua expressão em relação ao GC. Perfil semelhante foi apresentado pelo grupo Brown (figura 19D), em menores proporções, que alterou a expressão de 61% dos genes estudados. Estes resultados corroboram os dados apresentados até o momento neste relatório, que indicam maior potencial anti-angiogênico dos polifenóis das própolis Red e Brown em relação à Green.

Figura 19. Representação gráfica do ensaio de *SuperArray*. Foram avaliados 84 genes envolvidos no processo de angiogênese nos grupos estudados: **A)** Veículo; **B)** Green **C)** Red e **D)** Brown). As amostras que se apresentam na parte superior da linha 1 se caracterizam pelo aumento de expressão gênica, enquanto as amostras abaixo da linha 2 apresentam-se com expressão gênica inferior ao GC.

Apesar do grande número de genes que sofreram diminuição na sua expressão nos tratamentos com os polifenóis das própolis Red e Brown, foram poucos os genes que apresentaram diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle. Este fato se deu, principalmente, pelo desvio padrão entre as replicatas das amostras. Na figura 20 estão representados os genes que apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$).

Figura 20. Expressão relativa dos principais genes (RNAm, UA) envolvidos no processo de angiogênese e avaliados através do SuperArray. As células HUVEC foram tratadas a uma concentração final de 10µg/ml de polifenóis totais dos grupos Green, Red e Brown além do grupo controle e veículo (Etanol 0,1% v/v) * p<0,05.

Dentre os 84 genes presentes no array, alguns já haviam sido testados no processo de padronização das reações de qRT-PCR, como por exemplo, o VEGF e do FGF2, que confirmaram o resultado. Os polifenóis também reduziram a expressão de dois importantes receptores envolvidos na angiogênese (FLT1 e EDG1), além de aumentar a expressão de TIMP-1, inibidor das metaloproteases e do processo de formação de novos vasos. Além disso, os polifenóis das diferentes própolis reduziram a expressão de PDGF e do fator de transcrição AKT (Figura 20).

De posse dos resultados apresentados até o momento, a próxima etapa deste trabalho foi realizada em colaboração com a Johann Wolfgang Goethe-University, Alemanha, Faculdade de Medicina, Laboratório de Pathobiochemistry 1, coordenado pelo Professor Doutor Bernard Bruene, que detém grande experiência em estudos envolvendo angiogênese e o Fator de Induzível por Hipóxia (HIF).

4.9 Polifenóis da própolis modulam de distintas maneiras o fator de transcrição HIF-1 α

Iniciamos os experimentos pré-incubando as células endoteliais (EA.hy926) com os polifenóis das diferentes própolis (Green, Red e Brown -10 μ g/ml - 4h) para avaliar a expressão de HIF-1 α .

Figura 21. Os polifenóis da própolis modulam a expressão de HIF-1 α . Células endoteliais foram incubadas em normóxia e hipóxia durante 4 h na presença ou ausência dos diversos tipos de própolis.

Apenas a fração rica em polifenóis da própolis Red (PRP) foi capaz de inibir a expressão de HIF-1 α (Figura 21). Observamos também que os polifenóis não apresentaram nenhuma influência significativa sobre o fator de transcrição AKT e sua forma fosforilada, pAKT. A partir destes experimentos, seguimos com os próximos protocolos utilizando apenas PRP, dado que foi a amostra que apresentou maior influência na expressão de HIF-1 α (Figura 21B).

4.10 Polifenóis da própolis Red (PRP) inibem a auto-diferenciação de *stem cells* em células CD31 positivas

Como a diferenciação de células precursoras em células endoteliais desempenha um papel crucial no desenvolvimento de novos vasos sanguíneos, avaliamos o impacto do PRP na diferenciação de *embryonic bodies* (EBs) em células CD31 positivas. Observamos que o tratamento durante 5 dias com PRP (10 µg/mL) reduziu a autodiferenciação de *stem cells* em células positivas para CD31 (marcador de célula endotelial) em relação aos controles (Figura 22).

Figura 22. Auto diferenciação de *stem cells* em células positivas para CD31. Os embryonic bodies (EBs) foram gerados usando 1000 células/35 µl de meio através da técnica de *hanging drops*. As gotas foram cultivadas em placas de 10 cm por 2 dias sem adição de LIF. Após este período os EBs (15 por prato) foram cultivados em placas Lumox (Greiner Bio-one, Frickenhausen, Germany) por mais 2 dias até haver aderência completa dos EBs e assim iniciou-se o tratamento por mais 5 dias consecutivos. PRP foi diluído em meio de cultura na concentração de 10 µg/ml, para controle foi adicionado meio de cultura com 0,1% de etanol.

4.11 PRP inibe a expressão de VEGF em células endoteliais

Demonstrando ser um importante inibidor do processo angiogênico através de experimentos *in vivo*, *ex vivo* e *in vitro*, focamos nosso trabalho em demonstrar o mecanismo de ação de PRP sobre o fator de transcrição HIF-1 α . Um dos principais genes reguladores do processo angiogênico e regulado por HIF-1 α é o VEGF. Como esperado, houve indução da expressão de VEGF durante a exposição das células endoteliais à hipóxia (Figura 23A). Este aumento de expressão foi acompanhado do aumento da secreção de VEGF-proteína no meio de cultura até 16 h, pois após 24 h a expressão de RNAm VEGF foi reduzida, porém os níveis de proteína no meio de cultura continuaram elevados (Figura 23B). PRP foi capaz de reduzir significativamente ($p < 0.05$) tanto a expressão quanto a secreção de VEGF quando adicionado sob hipóxia em células endoteliais em todos os tempos estudados. Observou-se ainda redução significativa de VEGF (RNAm e proteína secretada) sob normóxia e na presença de um mimetizador de hipóxia, (DMOG; figura 23C e 23B). Levando em consideração que a expressão de VEGF é induzida por hipóxia, bem como que DMOG pode estar diretamente ligada ao fator indutor de hipóxia (HIF-1), determinou-se o impacto do PRP na expressão de HIF-1 α .

Figura 23. PRP inibe a expressão de VEGF em células endoteliais (CE's). (A) ECs foram incubadas com PRP (10µg/ml) por vários tempos distintos (4, 8, 16 and 24 h) sob hipóxia (1%O₂). Em cada tempo foi avaliado a expressão de RNAm por RT-PCR. (B) Os sobrenadantes foram coletados e a quantidade de VEGF no meio foi avaliada por ELISA. (C) VEGF RNAm e VEGF secretado (D) foram avaliados em normóxia (21% O₂) ou em presença de DMOG (1 mM). Valores estão representados em medias ± DP (n≥3).

* = p<0.05).

4.12 PRP inibe a expressão HIF-1 α de modo dose e tempo dependente e a expressão dos seus principais genes alvo

Na tentativa de compreender como o PRP pode reduzir a expressão do VEGF, os experimentos foram direcionados para avaliar a regulação da expressão de HIF-1 α , e consequentemente a expressão de genes alvo de HIF-1 α . Como demonstrado na figura 24A, sob hipóxia há um acúmulo de HIF-1 α , atenuado pelo PRP de forma dose dependente. A inibição de HIF-1 α ocorreu nas concentrações de 0,6 – 10 μ g/ml (figura 24B), sendo que, na concentração de 10 μ g/ml, houve inibição quase total da expressão de HIF-1 α . Além disso, PRP apresentou um mecanismo de inibição tempo-dependente, com máxima atuação com 4h de incubação.

As consequências funcionais da inibição de HIF-1 α em células endoteliais foram demonstradas através da avaliação de seus genes alvo, ou seja, aqueles regulados por HIF-1 α (figura 24C). Observamos que a expressão de adrenomedulina (ADM) e do transportador-1 de glicose (Glut-1) estavam elevadas durante a exposição à hipóxia, mas substancialmente reduzidos na presença de PRP, demonstrando que a regulação de HIF-1 α por PRP está relacionada com a perda de funcionalidade do fator de transcrição HIF-1 α . Ressalta-se que não houve mudança na expressão de HIF-1 α em presença de PRP nas células submetidas à hipóxia e normóxia (figura 24D), demonstrando que PRP aparentemente atua em uma via pós-transcricional.

Figure 24. PRP inibe a expressão da proteína HIF-1α e seus genes dependentes. A expressão de HIF-1α foi influenciada por PRP de modo (A) dose- e (B) tempo-dependente. A inibição completa de HIF-1α por PRP ocorreu na concentração de 10 μg/mL. Adicionalmente, PRP bloqueou a acumulação de HIF-1α depois de 4 h. (C) Os genes regulados por HIF-1α foram afetados por PRP. (D) Não houve alteração na expressão de HIF-1α RNAm. Valores estão representados como médias ± DP (n≥3). * = p<0.05.

4.13 PRP diminui a estabilidade da proteína HIF-1 α

Dado que não houve mudança na expressão de RNAm HIF-1 α em presença de PRP (Figura 24D), foi excluída a possibilidade de que a inibição na expressão de HIF-1 α por PRP ocorra ao nível transcricional. Para investigar de que forma a instabilidade de HIF-1 α ocorre em presença de PRP, primeiro foi avaliado o impacto do PRP na meia-vida da proteína HIF-1 α . Incubamos células endoteliais por 4 h em presença de 1% de oxigênio para que houvesse acúmulo de HIF-1 α . Ao final das 4h, para bloquear a tradução, o que se refletiria na inibição da síntese *de novo* de HIF-1 α , adicionamos ao meio de cultura 10 mM cicloheximida (CHX) em presença ou ausência de PRP. Avaliamos a expressão de HIF-1 α ao longo dos próximos 60 min. A proteína HIF-1 α foi mais estável na ausência de PRP ($t_{1/2}$ = 58,5 min), comparado com o tratamento com PRP ($t_{1/2}$ = 38,5 min; Figura. 25A e 25B).

Como a proteína HIF-1 α é degradada através do proteossomo, o próximo passo foi determinar se PRP afetaria o acúmulo da proteína HIF-1 α em condições de normoxia utilizando um inibidor de proteossomo. Conforme mostrado na figura 25C, PRP não impediu a acumulação de HIF-1 α induzida por MG132, em 3 a 4 h de incubação.

Outra evidência que tornou claro o papel de PRP na degradação de HIF-1 α foi obtida com experimentos em células de carcinoma de células renais (RCC4) que são deficientes na E3 ubiquitina-proteína de von Hippel-Lindau-ligase (pVHL). pVHL é necessária para a eficiente degradação de HIF-1 α via proteossomo. Em células RCC4, PRP não conseguiu alterar a expressão constitutiva da proteína HIF-1 α , quando incubado até 4 h (figura 25D). Quando pVHL foi reconstituído na linhagem RCC4 (RCC4/pVHL) o sinal de HIF-1 α induzido por hipóxia voltou a ser sensível ao PRP, com a expressão de HIF-1 α desaparecendo ao longo de incubação de 4 hs (figura 25E).

Figura 25 . PRP regula a expressão de HIF-1α em parte acelerando a degradação de HIF-1α via mecanismo dependente de pVHL. (A) CEs foram incubadas sob hipóxia por 4h (1%O₂) e depois tratadas com cicloheximida (CHX 10µM) na presença ou ausência de PRP (10µg/ml). (B) Representa a meia vida de HIF-1α. (C) PRP não influencia a síntese de HIF-1α. Células (D) RCC4 e (E) RCC4/pVHL foram incubadas na presença de PRP (10 µg/ml) com diferentes momentos (1, 2, 3, 4 h). Os valores estão representados como médias ± DP (n≥3). * = p<0.05.

4.14 PRP induz a expressão de pVHL através da inibição de Cdc42

Para explorar os possíveis mecanismos que poderiam explicar a degradação proteossômica do HIF-1 α induzida por PRP considerou-se o complexo ubiquitina ligase, incluindo pVHL. Sob hipóxia, notamos uma diminuição na expressão de pVHL que foi totalmente compensada pela presença de PRP (Figura 26). Curiosamente, sob hipóxia PRP reduziu a expressão da proteína Cdc42 em células endoteliais (Figura 25). Sugestivamente, PRP suprime a expressão Cdc42 sob condições de hipóxia, o que permite recuperar a expressão de pVHL concomitantemente, diminuindo HIF-1 α . Com a redução da expressão de Cdc42 por PRP, houve aumento da expressão de pVHL e consequentemente aumento da degradação de HIF-1 α .

Figura 26. PRP bloqueia a expressão de HIF-1 α aumentando a expressão de pVHL sob hipóxia (1% O₂) e inibindo a expressão de Cdc42. Células endoteliais foram incubadas em normóxia (21% O₂) e hipóxia (1% O₂) na presença ou ausência PRP (10 µg/ml) por 4 h.

5. DISCUSSÃO

A interação entre compostos bioativos presentes nos alimentos e doenças crônicas vem despertando cada vez mais atenção da comunidade científica. Com isso, diversos trabalhos vêm emergindo com o objetivo de avaliar a influência do consumo destes compostos na prevenção e/ou como coadjuvante na terapêutica de diversas destas doenças.

No presente trabalho investigamos a influência do consumo de polifenóis da própolis sobre o desenvolvimento e progressão da placa de ateroma em modelo de camundongos $LDLr^{-/-}$, assim como no processo de angiogênese. Através da inibição de fatores pró-aterogênicos e pró-angiogênicos, demonstramos a capacidade das frações ricas em polifenóis da própolis em modular o desenvolvimento de lesões ateroscleróticas. Adicionalmente, as frações ricas em polifenóis da própolis foram capazes de modular a angiogênese inibindo a expressão de genes envolvidos no processo de desenvolvimento de novos vasos, assim como, nas diversas etapas do processo angiogênico. Observamos, ainda, que os polifenóis da própolis Red (PRP) desestabilizam o fator de transcrição HIF-1 α através da inibição de Cdc42, agente supressor de pVHL, promovendo aumento da expressão de pVHL e consequente aumento da degradação de HIF-1 α .

Sabe-se que alterações no perfil lipídico estão presentes em pacientes com aterosclerose, principalmente níveis elevados de TAG, CT, LDL-C e non-HDL-C, além das baixas concentrações de HDL-C (Gonzalez-Santiago *et al.*, 2006; Amarenco *et al.*, 2008). A análise do perfil lipídico de camundongos $LDL^{-/-}$ suplementados com frações ricas em polifenóis dos três tipos de própolis reduziram o CT e elevaram o HDL-C em camundongos $LDLr^{-/-}$ com lesões ateroscleróticas iniciais (LI). Considerando a associação

entre aterosclerose e alterações do perfil lipídico, é razoável supor que os polifenóis de própolis modulam o perfil dos lipídios séricos, com consequentes efeitos na prevenção e no desenvolvimento de lesões ateroscleróticas. Os resultados do nosso estudo sugerem que o efeito protetor dos polifenóis contra a progressão da área de lesão aterosclerótica pode ser atribuído, pelo menos em parte, à sua capacidade em melhorar o perfil lipídico.

É interessante ressaltar que os polifenóis da própolis Red também induziram diminuição significativa da expressão gênica de CD36 em comparação com polifenóis de Brown e Green. O CD36 é um receptor *scavenger* envolvido no influxo de colesterol e é considerado um gene alvo no desenvolvimento da aterosclerose e sua hipo-regulação contribui para reduzir a captação de LDL por macrófagos e consequente formação de células espumosas (Collot-Teixeira *et al.* 2007; Manning-Tobin *et al.*, 2009). Em contrapartida, o ATP-cassete transporter A1 (ABCA1) é um receptor de membrana envolvido no efluxo de colesterol (Alexander *et al.* 2009) e todos os grupos suplementados com polifenóis na LI apresentaram uma menor expressão de RNAm do gene ABCA1, sugerindo um melhor efluxo de colesterol dos macrófagos, impedindo a formação de células espumosas e consequente progressão da lesão aterosclerótica.

Apesar de muito utilizado, sabe-se que apenas a avaliação do perfil lipídico não é suficiente para indicar o risco cardiovascular. Uma vez que tem sido demonstrado que a aterosclerose é uma doença inflamatória multifatorial, os biomarcadores inflamatórios têm sido adotados para a predição de risco cardiovascular (Packard & Libby, 2008). Neste estudo, os polifenóis da própolis reduziram a expressão de fatores inflamatórios com maior intensidade na fase inicial da lesão aterosclerótica, em comparação com a lesão avançada. Estes resultados poderiam ser explicados considerando-se a complexidade da lesão avançada (Koenig & Khuseyinova, 2007).

No processo da doença aterosclerótica, a inflamação desempenha papel fundamental com a presença de fatores pró-inflamatórios tais como interleucina-6 (IL-6), interferon-gama (IFN- γ) e fator beta transformador de crescimento (TGF β) secretados por células espumosas derivadas de macrófagos, que amplificam a reação inflamatória local. A IL-6 promove a síntese de proteínas de fase aguda e da proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1), que estimula a migração de monócitos para a íntima (Tieu *et al.*, 2009). A posterior exposição dos monócitos ao fator estimulador de colônia de macrófagos (M-CSF) induz a diferenciação a macrófagos. Embora apenas o grupo Red tenha apresentado redução na progressão da lesão, a expressão de MCP-1 (RNAm) foi reduzida em ambos os protocolos (LI e LA) e em todos os grupos tratados com polifenóis. Estes resultados demonstraram um papel anti-aterogênico e anti-inflamatório dos polifenóis da própolis em camundongos LDLr^{-/-}. Segundo Babu & Liu (2008), os potenciais mecanismos moleculares de ação dos polifenóis com atividade anti-inflamatória não se limitam à inibição de enzimas relacionadas à inflamação, como a ciclooxygenase e lipoxigenase, mas inclui a modulação de outros marcadores moleculares.

A atividade antioxidante dos polifenóis já está bem descrita na literatura (Oyagbemi *et al.*, 2009; Nicholson *et al.*, 2008). Considera-se que polifenóis, especialmente flavonas (grupo de polifenóis de maior abundância na própolis Red), têm a capacidade de estimular a resposta antioxidante na células, o que resulta na indução de uma variedade de genes, incluindo a heme oxigenase-1 (HO-1; Choi *et al.*, 1996). Os polifenóis da própolis foram capazes de regular a expressão de HO-1 em todos os grupos tratados nos protocolos LI e LA. Nosso estudo demonstrou que a HO-1, uma enzima com ação antioxidante que desempenha papel importante na resposta inflamatória, e conseqüentemente no processo de proteção ao desenvolvimento da

aterogênese (Song *et al.*, 2009), tem sua expressão (RNAm) exacerbada por polifenóis na própolis. Houve ainda, diminuição da expressão de RNAm do fator pro-inflamatório TGF β , que apresenta relação estreita com os processo de angiogênese na aterosclerose.

O processo de angiogênese é fundamental no desenvolvimento da aterosclerose. As lesões ateroscleróticas são altamente vascularizadas, em comparação com os tecidos normais (Sirol *et al.*, 2009). Biomarcadores angiogênicos foram determinados em lesões iniciais e avançadas. Nas lesões iniciais, houve diminuição da expressão gênica da Angiopietina I e II, FGF e PDGF em todos os grupos suplementados com os polifenóis. O PDGF é um mitógeno importante e atua como quimiotático para monócitos com papel importante na aterosclerose por estimular a ação das metaloproteinases (Wågsäter *et al.*, 2009). O efeito anti-angiogênico de polifenóis da própolis também foi observado por expressão elevada do inibidor de metaloproteinases (TIMP-1), principalmente nas lesões iniciais. O aumento na expressão gênica do TIMP-1 corroborou com a redução da expressão do gene da MMP-9, embora no protocolo de LA apenas o grupo Red tenha apresentado aumento na expressão de TIMP-1. Segundo Chung *et al.* (2009), as metaloproteinases (MMPs), como MMP-2 e MMP-9, degradam parte da matriz extracelular, favorecendo a ruptura da placa aterosclerótica.

O VEGF é um importante fator regulador da angiogênese, contribuindo para o agravamento da aterosclerose (Lucerna *et al.*, 2007). Neste estudo, a expressão do gene do VEGF apresentou-se reduzida nos grupos suplementados com polifenóis em relação ao GC. Adicionalmente, os biomarcadores relacionados com o recrutamento de monócitos e adesão celular, VCAM-1 e PECAM-1 respectivamente, diminuíram significativamente (RNAm e proteína) nos grupos suplementados com os polifenóis, sugerindo uma associação inversa entre o consumo diário de polifenóis da própolis e o

processo angiogênico e inflamatório na aterosclerose. De acordo com Kleinhans *et al.* (2009), as moléculas de adesão são induzidas por citocinas pró-inflamatórias. Assim, a redução da expressão gênica de PECAM-1 e VCAM-1 observada neste estudo vai ao encontro à diminuição da expressão gênica observada para algumas citocinas pró-inflamatórias, principalmente para animais tratados com a própolis Red.

Neste estudo, é interessante notar que os polifenóis da própolis Red foram os únicos a exercer efeitos benéficos em lesões ateroscleróticas avançadas. Neste caso, a modulação dos biomarcadores CD36, HO-1 e TIMP-1 pode ter sido um dos principais fatores para esta ação inibitória sobre a aterosclerose. Além disso, os polifenóis da própolis Red tiveram efeito mais pronunciado na inibição da expressão do CD36 e na indução da expressão de HO-1, em comparação com os outros grupos. Adicionalmente, observou-se aumento da expressão do TIMP-1 em lesões avançadas, enquanto o mesmo efeito não foi observado para os polifenóis das própolis Green e Brown.

Os diferentes potenciais dos distintos tipos própolis em modular a progressão da lesão ateroscleróticas, assim como dos marcadores do processo de angiogênese, podem estar associados à composição de polifenóis dos mesmos. Segundo Alencar *et al.* (2007), diferentemente de outros própolis, polifenóis da própolis Red demonstraram a presença predominante de isoflavonóides e pterocarpanos. Destaca-se, principalmente, a presença de quatro isoflavonas: dihidroxiiisoflavona, homopterocarpina, medicarpina e 4',7-dimethoxy-2'-isoflavona, as quais nunca foram encontradas nos demais tipos de própolis brasileiras e que possuem efeitos biológicos ainda desconhecidos. A predominância destes polifenóis específicos pode ser o fator chave nos efeitos benéficos apresentados pelo grupo Red em relação ao Green e Brown.

Neste contexto, a próxima etapa deste trabalho visou investigar o potencial modulatório dos polifenóis das diferentes própolis especificamente no processo de

angiogênese em modelos experimentais *in vivo*, *ex vivo* e *in vitro*. Foram realizados ensaios *in vitro* para caracterizar o potencial anti-angiogênico dos polifenóis da própolis sobre células endoteliais, através de ensaio de proliferação e migração celular. Em ambos os ensaios, os polifenóis das diferentes própolis demonstraram capacidade de inibir a proliferação e migração de células endoteliais, eventos primordiais no processo angiogênico. A proliferação e a migração de células endoteliais são os eventos mais importantes na angiogênese e são também coadjuvantes de várias doenças cardiovasculares, incluindo a aterosclerose. Alguns estudos indicam que os polifenóis são capazes de inibir a proliferação e a migração de células endoteliais, entretanto, vários mecanismos foram descritos até o momento (Cecconi *et al.*, 2008; Keshavarz *et al.*, 2009). O resveratrol, principal polifenol encontrado em vinhos tintos e também presente na própolis, inibe a proliferação celular, impedindo a progressão do ciclo celular nas fases S e G2 (Shankar *et al.*, 2007; Hong *et al.*, 2009). Estes efeitos são acompanhados pelo aumento da expressão da proteína supressora de tumor p53 e da elevação do nível da p21 kinase dependente de ciclina (WAF1/CIP1). Um outro polifenol, a delphinidina, inibe potencialmente a proliferação e migração de células endoteliais através da ciclina D12, dependente de rotas responsivas ao VEGF (Lamy *et al.*, 2006). Os polifenóis do chá verde reduzem significativamente a proliferação celular de forma dose dependente, devido à permanência das células na fase G1, mas sem afetar a viabilidade celular.

Por outro lado, alguns polifenóis suprimem a proliferação e a migração de células endoteliais através da indução de apoptose por meio da despolarização da membrana mitocondrial, ativação da caspase-3, redução da ligação do VEGF aos seus receptores, além de influenciar o processo de migração celular, através da diminuição da expressão dos fatores de transcrição CREB e ATF-1, e pela inibição específica das vias p38 MAPK

e PI3-kinase/ AKT (Stoclet *et al.* 2004).

Neste estudo, o ensaio *ex vivo* com os anéis de aorta tratados com os polifenóis, observou-se que as células endoteliais foram capazes de migrar para a matriz de colágeno, entretanto não foram capazes de se organizar para a formação de tubos. Portanto, neste modelo confirmou-se o potencial anti-angiogênico dos polifenóis extraídos das diferentes própolis. Além disso, realizou-se o experimento com o modelo da CAM, onde foi avaliada a capacidade da formação de novos vasos, a partir de vasos pré-existentes, em membrana corioalantóica de embrião de galinha. No ensaio da CAM, observamos que os polifenóis das diferentes própolis foram capazes de inibir a formação de novos vasos, também a partir de vasos pré-existentes. Além disso, utilizando a técnica de corpos embrionicos (*embryonic bodies*, EB) com *stem cells*, os polifenóis da própolis Red foram capazes de inibir a auto-diferenciação destas células em CD31, marcador de células endoteliais.

A angiogênese é um processo de formação de novos vasos a partir de vasos pré-existentes. Embora este processo esteja presente em diversos processos fisiológicos, já está bem documentado que em certas condições patológicas este processo está associado com o agravamento da doença. Por isto, o fator de transcrição HIF-1 desempenha papel fundamental no desenvolvimento de doenças associadas às condições de hipóxia e angiogênese (Milkiewicz *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2009). Estudos recentes (Jung *et al.*, 2010; Hirota *et al.*, 2009) têm sido realizados com objetivo de identificar compostos que inibem o acúmulo de HIF-1 α , até o momento subunidade mais importante e estudada de HIF-1, demonstrando a importância deste fator de transcrição.

Os resultados deste trabalho demonstraram, pela primeira vez, que os polifenóis da Red própolis (PRP) suprimem a expressão Cdc42 em condições de hipóxia, facilitando o aumento da expressão pVHL. Por conseguinte, PRP atenuou o acúmulo de HIF-1 α , o que levou à supressão dos genes-alvo regulados por esta subunidade do fator de transcrição HIF-1 (VEGF, ADM e GLUT-1), proporcionando concomitantemente a resposta anti-angiogênica em células endoteliais.

Estudos epidemiológicos sugerem que a ingestão de polifenóis reduzem a incidência de várias doenças que são associadas com aumento da expressão de VEGF e angiogênese, como aterosclerose e câncer (Klement *et al.*, 2007; Kavantzias *et al.*, 2006; Tham *et al.*, 1998; Oak *et al.*, 2005). Assim, o VEGF tem sido considerado um importante alvo terapêutico e diferentes fármacos têm sido utilizados para sua inibição (Neufeldt *et al.*, 1999; Holash *et al.*, 2002; Elias *et al.*, 2006). O PRP reduziu a expressão de VEGF em nível transcrricional, assim como, a secreção da proteína VEGF em meio de cultura de células endoteliais, em condições de normoxia e hipóxia. Estes dados estão de acordo com os de Sagar *et al.* (2006), os quais demonstraram que alguns polifenóis podem inibir o processo de angiogênese, diminuindo a expressão gênica do VEGF através de mecanismos transcrionais e transducionais. Adicionalmente, Fang *et al.* (2005) atribuíram a propriedade anti-tumoral da apigenina, polifenol frequentemente encontrado na dieta humana, à inibição de HIF-1 α e à expressão do VEGF mediada através PI3K/AKT/p70S6K1 e/ou dependente de HDM2/p53. Além disso, polifenóis da semente de uva (grape seed extract; GSE) foram capazes de suprimir o processo angiogênico, inibindo a produção de VEGF em células de câncer de próstata através da inibição da via de sinalização do receptor de VEGF (VEGFR 1 e 2; Singh *et al.*, 2004; Wen *et al.*, 2008). O GSE inibiu ainda a expressão de VEGF em células de câncer de mama humano e células de glioma humano através da inibição da

expressão da proteína HIF-1 α , mas não teve nenhum efeito aparente inibitório na expressão do RNAm do HIF-1 α (Lu *et al.*, 2009).

O VEGF, assim como muitos outros fatores tais como GLUT-1 ou ADM, é fundamental para a adaptação a ambientes de hipóxia e é primariamente regulado por HIF-1, sob condições privadas de oxigênio (Hu *et al.*, 2003). Neste estudo, os PRP promoveram a desestabilização do HIF-1 α através de uma maior degradação proteossômica dependente de pVHL. Portanto, considera-se que os PRP sejam capazes de aumentar a expressão da proteína pVHL, com possível aumento de sua atividade, resultando na desestabilização do HIF-1 α . Embora a perda de estabilidade HIF-1 α em condições de hipóxia, mesmo na presença de níveis elevados de pVHL, pareça um contraditória, Sun *et al.* (2006) destacaram a possibilidade de que o excesso da proteína pVHL resulte na regulação negativa da proteína HIF-1 α mesmo sob condições de hipóxia.

Demonstramos, ainda, que o aumento da expressão da proteína pVHL sob hipóxia, em resposta à PRP, se correlaciona com a expressão diminuída da Rho GTPase Cdc42. Segundo Torka *et al.* (2006), Cdc42 media a polaridade celular em vários sistemas, incluindo a migração de células em embriões, pelo centro organizador de microtúbulos (MTO), e a adequação do complexo de Golgi para a direção do movimento. A ativação e consequente aumento da expressão de Cdc42 está estreitamente relacionada com hipóxia e, consequentemente, com a promoção do processo angiogênico, principalmente com a migração de células endoteliais (Nys *et al.*, 2010).

Nossos achados indicam que os PRP reduzem a expressão de Cdc42 total em condições de hipóxia e induz a expressão de pVHL. A observação de que os níveis de pVHL aumentaram além dos níveis de expressão em normoxia pode ter importância para facilitar a degradação do HIF-1 α sob condições de hipóxia, ou seja, mesmo na ausência de hidroxilação eficiente de HIF-1 α (Nys *et al.*, 2010). Coincidentemente, a genisteína, um isoflavonoide encontrado principalmente na soja, suprime a expressão de HIF-1 α em resposta à hipóxia associada com a inibição da atividade de Cdc42 (Xue *et al.*, 2006).

Em resumo, nossos resultados fornecem evidências de que os polifenóis da própolis vermelha (PRP) tem efeitos antiangiogênico *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*, como resultado de uma inibição efetiva da expressão do VEGF. Um possível mecanismo associado a este efeito é a inibição de VEGF que foi atribuído à desestabilização de HIF-1 α em condições de hipóxia. A desestabilização de HIF-1 α é acompanhada por um aumento da expressão da ubiquitina ligase E3-pVHL como consequência da inibição da expressão de Cdc42. Portanto, os resultados deste trabalho demonstram o importante papel dos polifenóis da própolis vermelha como potencial produto natural para atenuar o processo de angiogênese e a aterosclerose.

6 CONCLUSÃO

De posse dos presentes resultados concluímos que:

1. As amostras de própolis de diferentes origens botânicas apresentam distintos perfis de compostos fenólicos, que inibem a progressão da placa aterosclerótica, modulando o perfil lipídico e os biomarcadores inflamatórios do processo aterosclerótico.
2. Os polifenóis dos diferentes tipos de própolis, principalmente os polifenóis da própolis vermelha, modulam negativamente diversas etapas do processo angiogênico..
3. Os polifenóis da própolis vermelha inibem a expressão de Cdc42, repressor de pVHL, consequentemente aumentando a instabilidade de HIF-1 α , principal fator de transcrição envolvido no processo angiogênico em condições de hipóxia.

Em resumo, estes dados sugerem que os polifenóis das própolis, principalmente da própolis vermelha, podem atuar como potenciais agentes preventivos da aterosclerose, reduzindo marcadores do processo inflamatório, assim como reduzindo o processo angiogênico.

7 REFRÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adelmann J, Passos M, Breyer DH, dos Santos MH, Lenz C, Leite NF, Lanças FM, Fontana JD. Exotic flora dependence of an unusual Brazilian própolis: the pinocembrin biomarker by capillary techniques. *J Pharm Biomed Anal.* 2007; 43(1):174-8.
- Ahn MR, Kunimasa K, Ohta T, Kumazawa S, Kamihira M, Kaji K, Uto Y, Hori H, Nagasawa H, Nakayama. Suppression of tumor-induced angiogenesis by Brazilian própolis: major component artepillin C inhibits in vitro tube formation and endothelial cell proliferation. *Cancer Lett.* 2007; 252(2):235-43.
- Ainsworth EA, Gillespie KM. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. *Nat Protoc.* 2007; 2(4):875-7.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K & Wlatter P (2002). *Molecular Biology of the Cell* (4th ed.). Garland Science. ISBN 0-8153-3218-1. pp. 120-121.
- Alencar SM, Oldoni TL, Castro ML, Cabral IS, Costa-Neto CM, Cury JA, Rosalen PL, Ikegaki M. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian própolis: red própolis. *J Ethnopharmacol.* 2007; 113(2):278-83.
- Alexander ET, Weibel GL, Joshi MR, Vedhachalam C, de la Llera-Moya M, Rothblat GH, Phillips MC, Rader DJ. Macrophage reverse cholesterol transport in mice expressing ApoA-I Milano. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009; 10:1496-501.
- Amarenco P, Labreuche J, Touboul PJ. High-density lipoprotein-cholesterol and risk of stroke and carotid atherosclerosis: a systematic review. *Atherosclerosis* 2008; 196(2):489-96.

- Antonov AS, Kolodgie FD, Munn DH & Gerrity RG. Regulation of macrophage foam cell formation by $\alpha V\beta 3$ integrin: potential role in human atherosclerosis. *American Journal of Pathology* 2004; 165: 247-258.
- Araújo FA, Rocha MA, Mendes JB, Andrade SP. Atorvastatin inhibits inflammatory angiogenesis in mice through down regulation of VEGF, TNF- α and TGF- $\beta 1$. *Biomed Pharmacother*. 2010; 64(1):29-34.
- Babu PV and Liu D. Green tea catechins and cardiovascular health: an update. *Curr Med Chem*. 2008; 15(18):1840-50.
- Badimon JJ, Fuster V, Cherebro JH. Coronary atherosclerosis: a multifactorial disease. *Circulation*. 1993; 87 suppl II:II3-16.
- Badimon L, Vilahur G, Padro T. Nutraceuticals and atherosclerosis: human trials. *Cardiovasc Ther*. 2010; 28(4):202-15.
- Bankova V, Popova M, Bogdanov S, Sabatini AG. Chemical composition of European propolis: expected and unexpected results. *Z Naturforsch C*. 2002; 57(5-6):530-3.
- Barret TB & Benditt EP. Platelet-derived growth factor gene expression in human atherosclerotic plaques and normal artery wall. *PNAS* 1998; 85, 2810-2814.
- Barros MP, Lemos M, Maistro EL, Leite MF, Sousa JP, Bastos JK, Andrade SF. Evaluation of antiulcer activity of the main phenolic acids found in Brazilian Green Propolis. *J Ethnopharmacol*. 2008; 120(3):372-377.
- Basu A & Penugonda K. Pomegranate juice: a heart-healthy fruit juice. *Nutrition Reviews* 2009; 67(1):49–56.
- Beecher GR. Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. *J Nutr*. 2003; 133(10):3248S-3254S.
- Bengmark S, Mesa MD, Gil A. Plant-derived health: the effects of turmeric and curcuminoids. *Nutr Hosp*. 2009; 24(3):273-81.

- Benkovic V, Knezevic AH, Orsolic N, Basic I, Ramic S, Viculin T, Knezevic F, Kopjar N. Evaluation of radioprotective effects of própolis and its flavonoid constituents: in vitro study on human white blood cells. *Phytother Res.* 2009; 23(8):1159-68.
- Bobik A, Agrotis A, Kanellakis P, Dilley R, Krushinsky A, Smirnov V, Tararak E, Condrón M & Kostolias G. Distinct patterns of transforming growth factor-beta isoform and receptor expression in human atherosclerotic lesions: colocalization implicates TGF-beta in fibrofatty lesion development. *Circulation* 1999; 99:2883-2891.
- Borrelli F, Izzo AA, Di Carlo G, Maffia P, Russo A, Maiello FM, Capasso F, Mascolo N. Effect of a própolis extract and caffeic acid phenethyl ester on formation of aberrant crypt foci and tumors in the rat colon. *Fitoterapia.* 2002; 73 Suppl 1:S38-43.
- Caine GJ, Lip GY, Blann AD. Platelet-derived VEGF, Flt-1, angiopoietin-1 and P-selectin in breast and prostate cancer: further evidence for a role of platelets in tumour angiogenesis. *Ann Med* 2004; 36:273-277.
- Cardoso RL, Maboni F, Machado G, Alves SH, de Vargas AC. Antimicrobial activity of própolis extract against *Staphylococcus coagulase positive* and *Malassezia pachydermatis* of canine otitis. *Vet Microbiol.* 2010; 142(3-4):432-4.
- Cecconi D, Zamò A, Parisi A, Bianchi E, Parolini C, Timperio AM, Zolla L, Chilosi M. Induction of apoptosis in Jeko-1 mantle cell lymphoma cell line by resveratrol: a proteomic analysis. *J Proteome Res.* 2008; 7(7):2670-80.
- Celletti FL, Waugh JM, Amabile PG, Brendolan A, Hilfiker PR, & Dake MD. Vascular endothelial growth factor enhances atherosclerotic plaque progression. *Nat. Med.* 2001; 7:425-429.
- Chen CH, Walterscheid JP. Plaque angiogenesis versus compensatory arteriogenesis in atherosclerosis. *Circ Res* 2006, 99:787-789.

- Chikaraishi Y, Izuta H, Shimazawa M, Mishima S, Hara H. Angiostatic effects of Brazilian green própolis and its chemical constituents. *Mol Nutr Food Res*. 2010; 54(4):566-75.
- Choi AM & Alam J. Heme oxygenase-1: function, regulation, and implication of a novel stress inducible protein in oxidant-induced lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1996; 15(1):9-19
- Chung AW, Yang HH, Sigrist MK, Brin G, Chum E, Gourlay WA, Levin A. Matrix metalloproteinase-2 and -9 exacerbate arterial stiffening and angiogenesis in diabetes and chronic kidney disease. *Cardiovasc Res*. 2009; 84(3):494-504.
- Collins T, Cybulsky MI. NF-kappaB: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis? *J Clin Invest*. 2001; 107:255-64.
- Collot-Teixeira S, Martin J, McDermott-Roe C, Poston R, McGregor JL. CD36 and macrophages in atherosclerosis. *Cardiovasc Res*. 2007; 75(3):468-77.
- Couffinhal T, Kearney M, Witzenbichler B, Chen D, Murohara T, Losordo DW, Symes J, Isner JM. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor (VEGF/VPF) in normal and atherosclerotic human arteries. *Am J Pathol*. 1997; 150(5):1673-85.
- Cybulsky MI, Liyama K, Li H. A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *J Clin Invest*. 2001; 107:1255-62.
- Daugusch A, Moraes CS, Fort P, Park YK. Brazilian red própolis-chemical composition and botanical origin. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2008; 5(4):435-441.
- Denizot F & Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods*. 1986; 89(2):271-7.

- Dorfman SE, Wang S, Vega-López S, Jauhiainen M, Lichtenstein AH. Dietary fatty acids and cholesterol differentially modulate HDL cholesterol metabolism in Golden-Syrian hamsters. *J Nutr*. 2005; 135(3):492-8.
- Dou QP. Molecular mechanisms of green tea polyphenols. *Nutr Cancer*. 2009; 61(6):827-35.
- Elias JA, Kang MJ, Crothers K, Homer R, Lee CG. State of the art. Mechanistic heterogeneity in chronic obstructive pulmonary disease: insights from transgenic mice. *Proc Am Thorac Soc*. 2006; 3(6):494-8.
- Etcheverry SB, Ferrer EG, Naso L, Rivadeneira J, Salinas V, Williams PA. Antioxidant effects of the VO(IV) hesperidin complex and its role in cancer chemoprevention. *J Biol Inorg Chem*. 2008; 13(3):435-47.
- Evans MR, Card PB, Gardner KH. ARNT PAS-B has a fragile native state structure with an alternative beta-sheet register nearby in sequence space. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106(8):2617-22.
- Fang J, Xia C, Cao Z, Zheng JZ, Reed E, Jiang BH. Apigenin inhibits VEGF and HIF-1 expression via PI3K/AKT/p70S6K1 and HDM2/p53 pathways. *FASEB J*. 2005; 19(3):342-53.
- Fedele AO, Whitelaw ML, Peet DJ. Regulation of gene expression by the hypoxia-inducible factors. *Mol Interv*. 2002; 2(4):229-43.
- Fishbein MC. The vulnerable and unstable atherosclerotic plaque. *Cardiovasc Pathol*. 2010; 19(1):6-11.
- Folkman J. Angiogenesis-dependent diseases. *Semin Oncol*. 2001; 28(6):536-42.
- Folkman J. Tumour angiogenesis: Therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971; 285:1182-1186.

- Fuster V. Mechanisms leading to myocardial infarction: insights from studies of vascular biology. *Circulation*. 1994; 90:2126-46.
- González-Santiago M, Martín-Bautista E, Carrero JJ, Fonollá J, Baró L, Bartolomé MV, Gil-Loyzaga P, López-Huertas E. One-month administration of hydroxytyrosol, a phenolic antioxidant present in olive oil, to hyperlipemic rabbits improves blood lipid profile, antioxidant status and reduces atherosclerosis development. *Atherosclerosis* 2006; 188(1):35-42.
- Hackam GD, Anand SS. Emerging risk factors for atherosclerotic vascular disease: a critical review of the evidence. *JAMA*. 2003; 290:932-40.
- Herrmann J, Lerman LO, Mukhopadhyay D, Napoli C, Lerman A: Angiogenesis in atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26:1948-1957
- Hirota SA, Beck PL, MacDonald JA. Targeting hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) signaling in therapeutics: implications for the treatment of inflammatory bowel disease. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov*. 2009; 3(1):1-16.
- Hoenig MR, Bianchi C, Sellke FW. Hypoxia inducible factor-1 alpha, endothelial progenitor cells, monocytes, cardiovascular risk, wound healing, cobalt and hydralazine: a unifying hypothesis. *Curr Drug Targets*. 2008; 9(5):422-35.
- Holash J, Davis S, Papadopoulos N, Croll SD, Ho L, Russell M, Boland P, Leidich R, Hylton D, Burova E, Ioffe E, Huang T, Radziejewski C, Bailey K, Fandl JP, Daly T, Wiegand SJ, Yancopoulos GD, Rudge JS. VEGF-Trap: a VEGF blocker with potent antitumor effects. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99(17):11393-8.
- Hong YB, Kang HJ, Kim HJ, Rosen EM, Dakshanamurthy S, Rondanin R, Baruchello R, Grisolia G, Daniele S, Bae I. Inhibition of cell proliferation by a resveratrol analog in human pancreatic and breast cancer cells. *Exp Mol Med*. 2009; 41(3):151-60.

- Hu CJ, Wang LY, Chodosh LA, Keith B, Simon MC. Differential roles of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and HIF-2alpha in hypoxic gene regulation. *Mol Cell Biol.* 2003; 23(24):9361-74.
- Ignatescu MC, Gharehbaghi-Schnell E, Hassan A, Rezaie-Majd S, Korschineck I, Schleef RR, Glogar HD & Lang IM. Expression of the angiogenic protein, platelet-derived endothelial cell growth factor in coronary atherosclerotic plaques: in vivo correlation of lesional microvessel density and constrictive vascular remodeling. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1999; 19:2340-2347.
- Izuta H, Shimazawa M, Tsuruma K, Araki Y, Mishima S, Hara H. Bee products prevent VEGF-induced angiogenesis in human umbilical vein endothelial cells. *BMC Complement Altern Med.* 2009; 9:45.
- Jiang C, Ganther H, Lu J. Monomethyl selenium--specific inhibition of MMP-2 and VEGF expression: implications for angiogenic switch regulation. *Mol Carcinog.* 2000; 29(4):236-50.
- Jung HJ, Shim JS, Lee J, Song YM, Park KC, Choi SH, Kim ND, Yoon JH, Mungai PT, Schumacker PT, Kwon HJ. Terpestacin inhibits tumor angiogenesis by targeting UQCRB of mitochondrial complex III and suppressing hypoxia-induced reactive oxygen species production and cellular oxygen sensing. *J Biol Chem.* 2010; 285(15):11584-95.
- Kampa M, Alexaki VI, Notas G, Nifli AP, Nistikaki A, Hatzoglou A, Bakogeorgou E, Kouimtoglou E, Blekas G, Boskou D, Gravanis A, Castanas E. Antiproliferative and apoptotic effects of selective phenolic acids on T47D human breast cancer cells: potential mechanisms of action. *Breast Cancer Res.* 2004; 6(2):R63-74.

- Kavantzias N, Chatziioannou A, Yanni AE, Tsakayannis D, Balafoutas D, Agrogiannis G, Perrea D. Effect of green tea on angiogenesis and severity of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbit. *Vascul Pharmacol*. 2006; 44(6):461-3.
- Keshavarz M, Mostafaie A, Mansouri K, Shakiba Y, Motlagh HR. Inhibition of corneal neovascularization with propolis extract. *Arch Med Res*. 2009; 40(1):59-61.
- Kim HK, Song KS, Park YS. Elevated levels of circulating platelet Amsterdam: Academic Press/Elsevier Sciences (USA) 2002; 491-502.
- Kleemann R, Zadelaar S, Kooistra T. Cytokines and atherosclerosis: a comprehensive review of studies in mice. *Cardiovasc Res*. 2008; 79(3):360-76.
- Kleinhans H, Kaifi JT, Mann O, Reinknecht F, Freitag M, Hansen B, Schurr PG, Izbicki JR, Strate TG. The role of vascular adhesion molecules PECAM-1 (CD 31), VCAM-1 (CD 106), E-selectin (CD62E) and P-selectin (CD62P) in severe porcine pancreatitis. *Histol Histopathol*. 2009; 24(5):551-7.
- Klement H, St Croix B, Milsom C, May L, Guo Q, Yu JL, Klement P, Rak J. Atherosclerosis and vascular aging as modifiers of tumor progression, angiogenesis, and responsiveness to therapy. *Am J Pathol*. 2007; 171(4):1342-51.
- Koenig W, Khuseyinova N. Biomarkers of atherosclerotic plaque instability and rupture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007; 27(1):15-26.
- Krol W, Scheller S, Czuba Z, Matsuno T, Zydowicz G, Shani J, Mos M. Inhibition of neutrophils' chemiluminescence by ethanol extract of propolis (EEP) and its phenolic components. *J Ethnopharmacol*. 1996; 55(1):19-25.
- Krol W, Scheller S, Shani J, Pietsz G, Czuba Z. Synergistic effect of ethanolic extract of propolis and antibiotics on the growth of staphylococcus aureus. *Arzneimittelforschung*. 1993; 43(5):607-9.

- Krupinski J, Stroemer P, Slevin M, Marti E, Kumar P, Rubio F: Three-dimensional structure and survival of newly formed blood vessels after focal cerebral ischemia. *Neuroreport* 2003; 14:1171-1176.
- Lamy S, Blanchette M, Michaud-Levesque J, Lafleur R, Durocher Y, Moghrabi A, Barrette S, Gingras D, Béliveau R. Delphinidin, a dietary anthocyanidin, inhibits vascular endothelial growth factor receptor-2 phosphorylation. *Carcinogenesis* 2006; 27(5):989-96.
- Lappalainen H, Laine P, Pentikainen MO, Sajantila A & Kovanen PT. Mast cells in neovascularized human coronary plaques store and secrete basic fibroblast growth factor, a potent angiogenic mediator. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2004; 24:1880-1885.
- Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002;420:868-74.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-delta delta c(t))} method. *Methods* 2001;25:402–8.
- Lu J, Zhang K, Chen S, Wen W. Grape seed extract inhibits VEGF expression via reducing HIF-1alpha protein expression. *Carcinogenesis* 2009; 30(4):636-44.
- Lu Y, Wu C, Yuan Z. Determination of hesperetin, cinnamic acid and nicotinic acid in própolis with micellar electrokinetic capillary chromatography. *Fitoterapia*. 2004; 75(3-4):267-76.
- Lucerna M, Zerneck A, de Nooijer R, de Jager SC, Bot I, van der Lans C, Kholova I, Liehn EA, van Berkel TJ, Yla-Herttuala S, Weber C, Biessen EA. Vascular endothelial growth factor-A induces plaque expansion in ApoE knock-out mice by promoting de novo leukocyte recruitment. *Blood*. 2007; 109(1):122-9.
- Lupia E, Pucci A, Peasso P, Merlo M, Baron P, Zanini C, Del Sorbo L, Rizea-Savu S, Silvestro L, Forni M, Emanuelli G, Camussi G & Montrucchio G. Intra-plaque

production of platelet-activating factor correlates with neoangiogenesis in human carotid atherosclerotic lesions. *International Journal of Molecular Medicine* 2003; 12:327-334.

Lupu F, Heim DA, Bachmann F, Hurni M, Kakkar VV & Kruithof EK. Plasminogen activator expression in human atherosclerotic lesions. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1995; 15:1444-1455.

Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature* 2000; 407:233-41.

Ma H, Calderon TM, Fallon JT & Berman JW. Hepatocyte growth factor is a survival factor for endothelial cells and is expressed in human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis* 2002; 164:79-87.

Magalhães LM, Segundo MA, Lima JL & Rangel AO. Automatic method for the determination of Folin–Ciocalteu reducing capacity in food products. *J. Agric. Food Chem.* 2006; 54:5241–5246.

Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr.* 2004; 79(5):727-47.

Manning-Tobin JJ, Moore KJ, Seimon TA, Bell SA, Sharuk M, Alvarez-Leite JI, de Winther MP, Tabas I, Freeman MW. Loss of SR-A and CD36 activity reduces atherosclerotic lesion complexity without abrogating foam cell formation in hyperlipidemic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009; 29(1):19-26.

Marxsen JH, Stengel P, Doege K, Heikkinen P, Jokilehto T, Wagner T, Jelkmann W, Jaakkola P, Metzen E. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) promotes its degradation by induction of HIF- α -prolyl-4-hydroxylases. *Biochem J.* 2004; 381 (Pt 3):761-7.

Maurin C, Bailly F, Cotellet P. Structure-activity relationships of HIV-1 integrase inhibitors-enzyme-ligand interactions. *Curr Med Chem.* 2003; 10(18):1795-810.

- Menezes H, Alvarez JM, Almeida E. Mouse ear edema modulation by different propolis ethanol extracts. *Arzneimittelforschung*. 1999; 49(8):705-7.
- Milkiewicz M, Ispanovic E, Doyle JL, Haas TL. Regulators of angiogenesis and strategies for their therapeutic manipulation. *Int J Biochem Cell Biol*. 2006; 38(3):333-57.
- Moreno PR, Purushothaman KR, Zias E, Sanj J, Fuster V: Neovascularization in human atherosclerosis. *Curr Mol Med*. 2006; 6:457-477.
- Moulton KS. Angiogenesis in atherosclerosis: gathering evidence beyond speculation. *Curr Opin Lipidol*. 2006; 17:548-555.
- Moura AC, Perazzo FF, Maistro EL. The mutagenic potential of *Clusia alata* (Clusiaceae) extract based on two short-term in vivo assays. *Genet Mol Res*. 2008; 7(4):1360-1368.
- Nagaoka T, Banskota AH, Tezuka Y, Midorikawa K, Matsushige K, Kadota S. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) analogues: potent nitric oxide inhibitors from the Netherlands propolis. *Biol Pharm Bull*. 2003; 26(4):487-91.
- Nakata A, Miyagawa J, Yamashita S, Nishida M, Tamura R, Yamamori K, Nakamura T, Nozaki S, Kameda-Takemura K, Kawata S, Taniguchi N, Higashiyama S & Matsuzawa Y. Localization of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in human coronary arteries: possible roles of HB-EGF in the formation of coronary atherosclerosis. *Circulation* 1996; 94: 2778-2786.
- Napoli C, Lerman A. Angiogenesis in atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26:1948-1957.
- Neufeldt G, Cohena T, Gengrinovitcha S, Poltoraka Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *The FASEB Journal* 1999; 13:9-22.
- Nicholson SK, Tucker GA, Brameld JM. Effects of dietary polyphenols on gene expression in human vascular endothelial cells. *Proc Nutr Soc*. 2008; 67(1):42-7.

- Nicosia RF & Ottinetti A. Growth of microvessels in serum-free matrix culture of rat aorta. A quantitative assay of angiogenesis in vitro. *Lab Invest* 1990; 63: 115-122.
- Nys K, Van Laethem A, Michiels C, Rubio N, Piette JG, Garmyn M, Agostinis P. A p38(MAPK)/HIF-1 pathway initiated by UVB irradiation is required to induce Noxa and apoptosis of human keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 2010; 130(9):2269-76.
- Oak MH, El Bedoui J, Schini-Kerth VB. Antiangiogenic properties of natural polyphenols from red wine and green tea. *J Nutr Biochem.* 2005; 16(1):1-8.
- Ohta T, Kunimasa K, Kobayashi T, Sakamoto M, Kaji K. Própolis suppresses tumor angiogenesis by inducing apoptosis in tube-forming endothelial cells. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2008; 72(9):2436-40.
- Oyagbemi AA, Azeez OI, Saba AB. Interactions between reactive oxygen species and cancer: the roles of natural dietary antioxidants and their molecular mechanisms of action. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2009; 10(4):535-44.
- Oztürk F, Kurt E, Cerçi M, Emiroglu L, Inan U, Türker M, Ilker S. The effect of própolis extract in experimental chemical corneal injury. *Ophthalmic Res.* 2000; 32(1):13-8.
- Packard RRS & Libby P . Inflammation in Atherosclerosis: From Vascular Biology to Biomarker Discovery and Risk Prediction. *Clinical Chemistry* 2008; 54:24-38.
- Pagé EL, Robitaille GA, Pouysségur J, Richard DE. Induction of hypoxia-inducible factor-1alpha by transcriptional and translational mechanisms. *J Biol Chem.* 2002; 277(50):48403-9.
- Paigen B, Morrow A, Holmes PA, Mitchell D, Williams RA. Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice. *Atherosclerosis* 1987; 68:231-240.
- Pavilonis A, Baranauskas A, Puidokaite L, Mazeliene Z, Savickas A, Radziūnas R. Antimicrobial activity of soft and purified própolis extracts] *Medicina (Kaunas).* 2008; 44(12):977-83.

Percy MJ, Zhao Q, Flores A, Harrison C, Lappin TR, Maxwell PH, McMullin MF, Lee FS.

A family with erythrocytosis establishes a role for prolyl hydroxylase domain protein 2 in oxygen homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103(3):654-9.

Pereira AD, de Andrade SF, de Oliveira Swerts MS, Maistro EL. First in vivo evaluation of the mutagenic effect of Brazilian green propolis by comet assay and micronucleus test. *Food Chem Toxicol*. 2008; 46(7):2580-2584.

Petrova A, Popova M, Kuzmanova C, Tsvetkova I, Naydenski H, Muli E, Bankova V. New biologically active compounds from Kenyan propolis. *Fitoterapia*. 2010; 81(6):509-14.

Piao M, Tokunaga O. Significant expression of endoglin (CD105), TGF β -1 and TGF β R-2 in the atherosclerotic aorta: An immunohistological study. *J Atheroscler Thromb*. 2006; 13(2):82-9.

Ratcliffe PJ. HIF-1 and HIF-2: working alone or together in hypoxia? *J Clin Invest*. 2007; 117(4):862-5.

Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr*. 1993; 123(11):1939-51.

Rodrigues CR, Dias JH, Semedo JG, da Silva J, Ferraz AB, Picada JN Mutagenic and genotoxic effects of *Baccharis dracunculifolia* (D.C.). *J Ethnopharmacol*. 2009; 124(2):321-4.

Sagar SM, Yance D, Wong RK. Natural health products that inhibit angiogenesis: a potential source for investigational new agents to treat cancer-Part 1. *Curr Oncol*. 2006; 13(1):14-26.

- Salomão K, de Souza EM, Henriques-Pons A, Barbosa HS, de Castro SL. Brazilian Green Própolis: Effects In Vitro and In Vivo on *Trypanosoma cruzi*. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2009.
- Sato F, Bhawal UK, Kawamoto T, Fujimoto K, Imaizumi T, Imanaka T, Kondo J, Koyanagi S, Noshiro M, Yoshida H, Kusumi T, Kato Y, Kijima H. Basic-helix-loop-helix (bHLH) transcription factor DEC2 negatively regulates vascular endothelial growth factor expression. *Genes Cells*. 2008; 13(2):131-44.
- Shankar S, Singh G, Srivastava RK. Chemoprevention by resveratrol: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Front Biosci*. 2007; 12:4839-54.
- Silva BB, Rosalen PL, Cury JA, Ikegaki M, Souza VC, Esteves A, Alencar SM. Chemical Composition and Botanical Origin of Red Própolis, a New Type of Brazilian Própolis. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2008
- Simon A, Megnien JL, Chironi G. The value of carotid íntima-media thickness for predicting cardiovascular risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010; 30(2):182-5.
- Singh RP, Tyagi AK, Dhanalakshmi S, AgarwalR, Agarwal C. Grape seed extract inhibits advanced human prostate tumor growth and angiogenesis and upregulates insulin-like growth factor binding protein-3. *International Journal of Cancer* 2004; 108:733-740.
- Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol*. 1999; 299:152–178.
- Sirol M, Moreno PR, Purushothaman KR, Vucic E, Amirbekian V, Weinmann HJ, Muntner P, Fuster V, Fayad ZA. Increased neovascularization in advanced lipid-rich atherosclerotic lesions detected by gadofluorine-M-enhanced MRI: implications for plaque vulnerability. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2009; 2(5):391-6.

- Slevin M, Kumar P, Gaffney J, Kumar S, Krupinski J: Can angiogenesis be exploited to improve stroke outcome? Mechanisms and therapeutic potencial. *Clin Sci* 2006; 111:171-183.
- Song J, Sumiyoshi S, Nakashima Y, Doi Y, Iida M, Kiyohara Y, Sueishi K. Overexpression of heme oxygenase-1 in coronary atherosclerosis of Japanese autopsies with diabetes mellitus: Hisayama study. *Atherosclerosis* 2009; 202(2):573-81.
- Song YS, Park EH, Hur GM, Ryu YS, Lee YS, Lee JY, Kim YM, Jin C. Caffeic acid phenethyl ester inhibits nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity. *Cancer Lett.* 2002; 175(1):53-61.
- Stoclet JC, Chataigneau T, Ndiaye M, Oak MH, El Bedoui J, Chataigneau M, Schini-Kerth VB. Vascular protection by dietary polyphenols. *Eur J Pharmacol.* 2004; 500(1-3):299-313.
- Sun X, Liu M, Wei Y, Liu F, Zhi X, Xu R, Krissansen GW. Overexpression of von Hippel-Lindau tumor suppressor protein and antisense HIF-1 α eradicates gliomas. *Cancer Gene Ther.* 2006; 13(4):428-35.
- Tham DM, Gardner CD, Haskell WL. Clinical review 97: Potential health benefits of dietary phytoestrogens: a review of the clinical, epidemiological, and mechanistic evidence. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998; 83(7):2223-35.
- Tieu BC, Lee C, Sun H, Lejeune W, Recinos A 3rd, Ju X, Spratt H, Guo DC, Milewicz D, Tilton RG, Brasier AR. An adventitial IL-6/MCP1 amplification loop accelerates macrophage-mediated vascular inflammation leading to aortic dissection in mice. *J Clin Invest.* 2009; 119(12):3637-51.

- Torka R, Thuma F, Herzog V, Kirfel G. ROCK signaling mediates the adoption of different modes of migration and invasion in human mammary epithelial tumor cells. *Exp Cell Res*. 2006; 312(19):3857-71.
- Touriño S, Lizárraga D, Carreras A, Lorenzo S, Ugartondo V, Mitjans M, Vinardell MP, Juliá L, Cascante M, Torres JL. Highly galloylated tannin fractions from witch hazel (*Hamamelis virginiana*) bark: electron transfer capacity, in vitro antioxidant activity, and effects on skin-related cells. *Chem Res Toxicol*. 2008; 21(3):696-704.
- Vergeer M & Stroes ES. The pharmacology and off-target effects of some cholesterol ester transfer protein inhibitors. *Am J Cardiol*. 2009 ; 104(10 Suppl):32E-8E.
- Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Fernández-López J, Pérez-Alvarez JA. Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. *J Food Sci*. 2008; 73(9):R117-24.
- Volpi N, Bergonzini G. Analysis of flavonoids from propolis by on-line HPLC-electrospray mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal*. 2006; 42(3):354-61.
- Wågsäter D, Zhu C, Björck HM, Eriksson P. Effects of PDGF-C and PDGF-D on monocyte migration and MMP-2 and MMP-9 expression. *Atherosclerosis* 2009; 202(2):415-23.
- Wen W, Lu J, Zhang K, Chen S. Grape seed extract inhibits angiogenesis via suppression of the vascular endothelial growth factor receptor signaling pathway. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2008; 1(7):554-61.
- Werno C, Menrad H, Weigert A, Dehne N, Goerdts S, Schledzewski K, Kzhyshkowska J, Brüne B. Knockout of HIF-1 α in tumor-associated macrophages enhances M2 polarization and attenuates their pro-angiogenic responses. *Carcinogenesis* 2010; 31(10):1863-72.
- Williams KJ, Telfer BA, Brave S, Kendrew J, Whittaker L, Stratford IJ, Wedge SR. ZD6474, a potent inhibitor of vascular endothelial growth factor signaling,

combined with radiotherapy: schedule-dependent enhancement of antitumor activity. *Clin Cancer Res.* 2004; 10(24):8587-93.

Williams MJ, Sutherland WH, Whelan AP, McCormick MP, de Jong SA. Acute effect of drinking red and white wines on circulating levels of inflammation-sensitive molecules in men with coronary artery disease. *Metabolism.* 2004; 53(3):318-23.

Xue Y, Bi F, Zhang X, Zhang S, Pan Y, Liu N, Shi Y, Yao X, Zheng Y, Fan D. Role of Rac1 and Cdc42 in hypoxia induced p53 and von Hippel-Lindau suppression and HIF1alpha activation. *Int J Cancer.* 2006; 118(12):2965-72.

Zhang J, Liu A, Hou R, Zhang J, Jia X, Jiang W, Chen J. Salidroside protects cardiomyocyte against hypoxia-induced death: a HIF-1alpha-activated and VEGF-mediated pathway. *Eur J Pharmacol.* 2009; 607(1-3):6-14.

Zhang Y, Ingram DA, Murphy MP, Saadatzadeh MR, Mead LE, Prater DN, Rehman J. Release of proinflammatory mediators and expression of proinflammatory adhesion molecules by endothelial progenitor cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009; 296(5):H1675-82.

Zhou J, Köhl R, Herr B, Frank R, Brüne B. Calpain mediates a von Hippel-Lindau protein-independent destruction of hypoxia-inducible factor-1alpha. *Mol Biol Cell.* 2006; 17(4):1549-58.

ANEXOS

ANEXO 1**Lista de genes analisados no *Super Array***

Símbolo	Descrição	Nome do gen
AKT1	V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1	AKT/PKB
ANGPT1	Angiopoietin 1	AGP1/AGP
ANGPT2	Angiopoietin 2	AGPT2/ANG2
ANGPTL3	Angiopoietin-like 3	ANGPT5
ANGPTL	Angiopoietin-like 4	ANGPTL2/ARP4
ANPEP	Alanyl (membrane) aminopeptidase (aminopeptidase N, aminopeptidase M, microsomal aminopeptidase, CD13, p150)	APN/CD13
BAI1	Brain-specific angiogenesis inhibitor 1	FLJ41988
CCL11	Chemokine (C-C motif) ligand 11	SCYA11
CCL2	Chemokine (C-C motif) ligand 2	GDCF-2/GDCF-2 HC11
CDH5	Cadherin 5, type 2, VE-cadherin (vascular epithelium)	7B4/CD144
COL18A1	Collagen, type XVIII, alpha 1	KNO
COL4A3	Collagen, type IV, alpha 3 (Goodpasture antigen)	TUMSTATIN
CXCL1	Chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity, alpha)	FSP/GRO1
CXCL10	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	C7/IF10
CXCL3	Chemokine (C-X-C motif) ligand 3	CINC-2b/GRO3
CXCL5	Chemokine (C-X-C motif) ligand 5	ENA-78/SCYB5
CXCL6	Chemokine (C-X-C motif) ligand 6 (granulocyte chemotactic protein 2)	CKA-3/GCP-2
CXCL9	Chemokine (C-X-C motif) ligand 9	CMK/Humig
TYMP	Thymidine phosphorylase	ECGF1/MNGIE
EDG1	Endothelial differentiation, sphingolipid G-protein-coupled receptor, 1	CHEDG1/D1S3362
EFNA1	Ephrin-A1	B61/ECKLG
EFNA3	Ephrin-A3	EFL2/EPLG3
EFNB2	Ephrin-B2	EPLG5/HTKL
EGF	Epidermal growth factor (beta-urogastrone)	HOMG4/URG
ENG	Endoglin (Osler-Rendu-Weber syndrome 1)	CD105/END
EPHB4	EPH receptor B4	HTK/MYK1
EREG	Epiregulin	ER
FGF1	Fibroblast growth factor 1 (acidic)	AFGF/ECGF
FGF2	Fibroblast growth factor 2 (basic)	BFGF/FGFB
FGFR3	Fibroblast growth factor receptor 3 (achondroplasia, thanatophoric dwarfism)	ACH/CD333
FIGF	C-fos induced growth factor (vascular endothelial growth factor D)	VEGF-D/VEGFD
FLT1	Fms-related tyrosine kinase 1 (vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor receptor)	FLT/VEGFR1
HAND2	Heart and neural crest derivatives expressed 2	DHAND2/Hed

Símbolo	Descrição	Nome do gen
AKT1	V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1	AKT/PKB
ANGPT1	Angiopoietin 1	AGP1/AGP
ANGPT2	Angiopoietin 2	AGPT2/ANG2
ANGPTL3	Angiopoietin-like 3	ANGPT5
ANGPTL	Angiopoietin-like 4	ANGPTL2/ARP4
ANPEP	Alanyl (membrane) aminopeptidase (aminopeptidase N, aminopeptidase M, microsomal aminopeptidase, CD13, p150)	APN/CD13
BAI1	Brain-specific angiogenesis inhibitor 1	FLJ41988
CCL11	Chemokine (C-C motif) ligand 11	SCYA11
CCL2	Chemokine (C-C motif) ligand 2	GDCF-2/GDCF-2 HC11
CDH5	Cadherin 5, type 2, VE-cadherin (vascular epithelium)	7B4/CD144
COL18A1	Collagen, type XVIII, alpha 1	KNO
COL4A3	Collagen, type IV, alpha 3 (Goodpasture antigen)	TUMSTATIN
CXCL1	Chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity, alpha)	FSP/GRO1
CXCL10	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	C7/IFI10
CXCL3	Chemokine (C-X-C motif) ligand 3	CINC-2b/GRO3
CXCL5	Chemokine (C-X-C motif) ligand 5	ENA-78/SCYB5
CXCL6	Chemokine (C-X-C motif) ligand 6 (granulocyte chemotactic protein 2)	CKA-3/GCP-2
CXCL9	Chemokine (C-X-C motif) ligand 9	CMK/Humig
TYMP	Thymidine phosphorylase	ECGF1/MNGIE
EDG1	Endothelial differentiation, sphingolipid G-protein-coupled receptor, 1	CHEDG1/D1S3362
EFNA1	Ephrin-A1	B61/ECKLG
EFNA3	Ephrin-A3	EFL2/EPLG3
EFNB2	Ephrin-B2	EPLG5/HTKL
EGF	Epidermal growth factor (beta-urogastrone)	HOMG4/URG
ENG	Endoglin (Osler-Rendu-Weber syndrome 1)	CD105/END
EPHB4	EPH receptor B4	HTK/MYK1
EREG	Epiregulin	ER
FGF1	Fibroblast growth factor 1 (acidic)	AFGF/ECGF
FGF2	Fibroblast growth factor 2 (basic)	BFGF/FGFB
FGFR3	Fibroblast growth factor receptor 3 (achondroplasia, thanatophoric dwarfism)	ACH/CD333
FIGF	C-fos induced growth factor (vascular endothelial growth factor D)	VEGF-D/VEGFD
FLT1	Fms-related tyrosine kinase 1 (vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor receptor)	FLT/VEGFR1
HAND2	Heart and neural crest derivatives expressed 2	DHAND2/Hed

HGF	Hepatocyte growth factor (hepapoietin A; scatter factor)	F-TCF/HGFB
HIF1A	Hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor)	HIF-1alpha/HIF1
HPSE	Heparanase	HPA/HPR1
ID1	Inhibitor of DNA binding 1, dominant negative helix-loop-helix protein	ID
ID3	Inhibitor of DNA binding 3, dominant negative helix-loop-helix protein	HEIR-1
IFNA1	Interferon, alpha 1	IFL/IFN
IFNB1	Interferon, beta 1, fibroblast	IFB/IFF
IFNG	Interferon, gamma	IFG/IFI
IGF1	Insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)	IGFI
IL1B	Interleukin 1, beta	IL-1/IL1-BETA
IL6	Interleukin 6 (interferon, beta 2)	BSF2/HGF
IL8	Interleukin 8	3-10C/AMCF-I
ITGAV	Integrin, alpha V (vitronectin receptor, alpha polypeptide, antigen CD51)	CD51/DKFZp686A08142
ITGB3	Integrin, beta 3 (platelet glycoprotein IIIa, antigen CD61)	CD61/GP3A
JAG1	Jagged 1 (Alagille syndrome)	AGS/AHD
KDR	Kinase insert domain receptor (a type III receptor tyrosine kinase)	CD309/FLK1
LAMA5	Laminin, alpha 5	KIAA1907
LECT1	Leukocyte cell derived chemotaxin 1	BRICD3/CHM-I
LEP	Leptin	OB/OBS
MDK	Midkine (neurite growth-promoting factor 2)	MK/NEG2
MMP2	Matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A, 72kDa gelatinase, 72kDa type IV collagenase)	CLG4/CLG4A
MMP9	Matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase)	CLG4B/GELB
NOTCH4	Notch homolog 4 (Drosophila)	INT3/NOTCH3
NRP1	Neuropilin 1	CD304/DKFZp686A03134
NRP2	Neuropilin 2	NP2/NPN2
PDGFA	Platelet-derived growth factor alpha polypeptide	PDGF-A/PDGF1
PECAM1	Platelet/endothelial cell adhesion molecule (CD31 antigen)	CD31/PECAM-1
PF4	Platelet factor 4 (chemokine (C-X-C motif) ligand 4)	CXCL4/SCYB4
PGF	Placental growth factor, vascular endothelial growth factor-related protein	D12S1900/PGFL
PLAU	Plasminogen activator, urokinase	ATF/UPA
PLG	Plasminogen	DKFZp779M0222
PLXDC1	Plexin domain containing 1	DKFZp686F0937/TEM3
PROK2	Prokineticin 2	BV8/KAL4
PTGS1	Prostaglandin-endoperoxide synthase 1 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)	COX1/COX3
SERPINF1	Serpin peptidase inhibitor, clade F (alpha-2 antiplasmin, pigment epithelium derived factor), member 1	EPC-1/PEDF
SPHK1	Sphingosine kinase 1	SPHK
STAB1	Stabilin 1	CLEVER-1/FEEL-1
TEK	TEK tyrosine kinase, endothelial (venous malformations, multiple cutaneous and mucosal)	CD202B/TIE-2
TGFA	Transforming growth factor, alpha	TFGA
TGFB1	Transforming growth factor, beta 1	CED/DPD1
TGFB2	Transforming growth factor, beta 2	TGF-beta2
TGFBR1	Transforming growth factor, beta receptor I (activin A receptor type II-like kinase,	AAT5/ACVRLK4

THBS1	Thrombospondin 1	THBS/TSP
THBS2	Thrombospondin 2	TSP2
TIMP1	TIMP metalloproteinase inhibitor 1	CLGI/EPA
TIMP2	TIMP metalloproteinase inhibitor 2	CSC-21K
TIMP3	TIMP metalloproteinase inhibitor 3 (Sorsby fundus dystrophy, pseudoinflammatory)	HSMRK222/K222
TNF	Tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)	DIF/TNF-alpha
TNFAIP2	Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 2	B94
VEGFA	Vascular endothelial growth factor A	VEGF/VEGF-A
VEGFC	Vascular endothelial growth factor C	Flt4-LVRP
B2M	Beta-2-microglobulin	B2M
HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (Lesch-Nyhan syndrome)	HGPRT/HPRT
RPL13A	Ribosomal protein L13a	RPL13A
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	G3PD/GAPD
ACTB	Actin, beta	PS1TP5BP1

ANEXO 2**Aprovação do projeto pelo Comissão de Ética em Experimentação Animal**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**Faculdade de Ciências Farmacêuticas**
Comissão de Ética em Experimentação Animal - CEEA

CEEA nº 17/2008

CERTIFICADO

*Certificamos que o Projeto “Modulação da neoangiogênese na aterosclerose por polifenóis da própolis” (Protocolo CEEA nº170), de responsabilidade do(a) pesquisador(a) **Julio Beltrame Daleprane** sob a orientação da Profa. Dra. Dulcinéia Saes Parra Abdalla, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) desta Faculdade, em 14/04/2008.*

São Paulo, 14 de abril de 2008.

Profa. Dra. Lígia Ferreira Gomes
Presidente da CEEA

CÓPIA

ANEXO 3

Certificação do Laboratório e Aprovação do projeto pela Comissão Interna de de Biossegurança FCF-USP.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão Interna de Biossegurança

Of.CIBio/0382010/FCF

São Paulo, 02 de setembro de 2010

Senhora Professora,

Conforme parecer favorável do relator, e de ordem do senhor Presidente da Comissão Interna de Biossegurança, informo a Vossa Senhoria que estamos aprovando "ad referendum" da Comissão Interna de Biossegurança da Faculdade de Ciências Farmacêuticas o Projeto "Nutrigenômica: Modulação da expressão de proteínas envolvidas no equilíbrio angiogênico na aterosclerose experimental por compostos bioativos da própolis".

Em anexo envio cópia do CQB da Unidade para necessário quando da solicitação de recursos junto a agências de fomento.

Lembramos que, quando da elaboração do Relatório Anual a ser encaminhado à Comissão Interna de Biossegurança esta Comissão solicitará a V.Sa. comprovante de participação em treinamentos de Biossegurança de sua equipe para manutenção do credenciamento.

Atenciosamente,

YARA MARIA LIMA MARDEGAN
Membro da CIBio

Ilma. Sra.

Profa. Dra. **DULCINÉIA SAES PARRA ABDALLA**

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF-USP

NESTA

ANEXO 4

Artigo aprovado para publicação no *Journal Nutritional Biochemistry*

Anti-atherogenic and anti-angiogenic activities of polyphenols from propolis[☆]

Julio Beltrame Daleprane^{a,b}, Vanessa da Silva Freitas^b, Alejandro Pacheco^c, Martina Rudnicki^b,
Luciane Aparecida Faine^b, Felipe Augusto Dörr^b, Masaharu Ikegaki^d, Luis Antonio Salazar^c,
Thomas Prates Ong^a, Dulcinéia Saes Parra Abdalla^{b,*}

^aDepartment of Food and Experimental Nutrition, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

^bDepartment of Clinical and Toxicology Analysis, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

^cDepartment of Basic Science, Faculty of Medicine, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile

^dDepartment of Pharmacy, Federal University of Alfenas, Alfenas, MG, Brazil

Received 7 June 2010; received in revised form 10 January 2011; accepted 22 February 2011

Abstract

Propolis is a polyphenol-rich resinous substance extensively used to improve health and prevent diseases. The effects of polyphenols from different sources of propolis on atherosclerotic lesions and inflammatory and angiogenic factors were investigated in LDL receptor gene (LDLR^{−/−}) knockout mice. The animals received a cholesterol-enriched diet to induce the initial atherosclerotic lesions (IALs) or advanced atherosclerotic lesions (AALs). The IAL or AAL animals were divided into three groups, each receiving polyphenols from either the green, red or brown propolis (250 mg/kg per day) by gavage. After 4 weeks of polyphenol treatment, the animals were sacrificed and their blood was collected for lipid profile analysis. The atheromatous lesions at the aortic root were also analyzed for gene expression of inflammatory and angiogenic factors by quantitative real-time polymerase chain reaction and immunohistochemistry. All three polyphenol extracts improved the lipid profile and decreased the atherosclerotic lesion area in IAL animals. However, only polyphenols from the red propolis induced favorable changes in the lipid profiles and reduced the lesion areas in AAL mice. In IAL groups, VCAM, MCP-1, FGF, PDGF, VEGF, PECAM and MMP-9 gene expression was down-regulated, while the metalloproteinase inhibitor TIMP-1 gene was up-regulated by all polyphenol extracts. In contrast, for advanced lesions, only the polyphenols from red propolis induced the down-regulation of CD36 and the up-regulation of HO-1 and TIMP-1 when compared to polyphenols from the other two types of propolis. In conclusion, polyphenols from propolis, particularly red propolis, are able to reduce atherosclerotic lesions through mechanisms including the modulation of inflammatory and angiogenic factors.

© 2011 Published by Elsevier Inc.

Keywords: Propolis; Polyphenols; Dietary supplementation; Atherosclerosis; Angiogenesis; Nutrigenomics

1. Introduction

In the past decades, the growing knowledge provided by scientific research on pathophysiology has provided us with new insights about the importance of disease connections. For instance, atherosclerosis, which has a high mortality rate in most populations, is better defined as an immune-inflammatory disease [1]. The atherosclerotic process initiates when macrophage cholesterol influx is greater than efflux, leading to disturbed cholesterol homeostasis and cholesteryl ester accumulation in cytoplasmic droplets [2]. The resulting macrophage-derived foam cells secrete pro-inflammatory factors, which amplify the local inflammatory reaction and produce reactive oxygen species, which, in turn, modify lipoproteins [2,3].

Additionally, the angiogenic process was shown to be increased in human and experimental atherosclerosis [4,5]. The development of

new blood vessels from the vasa vasorum is correlated with the severity of the atherosclerotic plaques and possibly with complications such as intraplaque hemorrhage and plaque rupture. Therefore, modulators of angiogenic process might be important in the progression of atherosclerosis [6–8].

Propolis is a polyphenol-rich resinous substance collected by honeybees (*Apis mellifera* L.) from a variety of plant sources. Its chemical composition is very complex, varies according to the geographic origin and depends on the local flora and phenology of the source plants [9]. Propolis has been widely used in folk medicine in various parts of the world for several applications including as an anti-inflammatory, cariostatic and antimicrobial agent [10–12]. In past times, in Eastern Europe propolis was used as a therapeutic product with satisfactory results. In Western European countries, in North and South America and in Japan, propolis did not acquire popularity until the 1980s. Nowadays, Japan is the leading importer of propolis, with a manifest preference for propolis from Brazil [10].

Although brown propolis is the most common, used and studied propolis worldwide [13–16], recent studies have also demonstrated the effect of green propolis in biological systems [17–19]. Postulated as a new type of propolis by Alencar et al. [20], red propolis has 63

[☆] This study was supported by grants from the Foundation for Research Support of the State of São Paulo (FAPESP-08/53756-7) to D.S.P.A. and a student scholarship to J.B.D. (08/53755-0).

* Corresponding author. Tel.: +55 11 30913637; fax: +55 11 38132197.
E-mail address: dsapa@usp.br (D.S.P. Abdalla).

Table 1
Forward and reverse primers used for real-time PCR experiments

Gene	Primer forward	Primer reverse
18S	5'-TGTGCTAACCGTTACCTGGCT-3'	5'-CAGTGCCACATACCAACTG-3'
INF6	5'-ATCTTCAAGCCATCTGTGTC-3'	5'-CAAGGCCACAGGGATTTC-3'
TGFβ	5'-TGTGCTAACCGTTACCTGGCT-3'	5'-CAGTGCCACATACCAACTG-3'
IL-6	5'-TCGCCAGAGTGGTTATCTTT-3'	5'-TAGTGAACCCGTGATGTCC-3'
CD36	5'-TGTGTGAAGGTGCAGTTTG-3'	5'-ATTCTGTGTGGCGCAGT-3'
HO-1	5'-CCCAAAACGACAAAGAGT-3'	5'-TGGTCTCGATGGTATTCTGG-3'
MCP1	5'-GAACCTTGACACGACAAGAAG-3'	5'-CAGTGAAGCGGTACATAGGG-3'
VCAM	5'-ATCTTCAAGCCATCTGTGTC-3'	5'-CAAGGCCACAGGGATTTC-3'
ABCA1	5'-CAAACATGTCAGCTGTTACTGG-3'	5'-CATTAAGGACATGCACAAGTCC-3'
ANG I	5'-TGTGCTAACCGTTACCTGGCT-3'	5'-CAGTGCCACATACCAACTG-3'
ANG II	5'-TCGCCAGAGTGGTTATCTTT-3'	5'-TAGTGAACCCGTGATGTCC-3'
VEGF	5'-TGTGTGAAGGTGCAGTTTG-3'	5'-ATTCTGTGTGGCGCAGT-3'
MMP2	5'-CCCAAAACGACAAAGAGT-3'	5'-TGGTCTCGATGGTATTCTGG-3'
MMP9	5'-GAACCTTGACACGACAAGAAG-3'	5'-CAGTGAAGCGGTACATAGGG-3'
FGF	5'-GCTGGCCAGCCGTGGAG-3'	5'-GAGTGCAGGGTCAGCACTAC-3'
PDGF	5'-TGTGCTAACCGTTACCTGGCT-3'	5'-CAGTGCCACATACCAACTG-3'
TIMP-1	5'-TCGCCAGAGTGGTTATCTTT-3'	5'-TAGTGAACCCGTGATGTCC-3'
PECAM	5'-TCCAGACCGTCCAGAAGAACTCC-3'	5'-CACCGAAGCACCATTTCATCTCC-3'

biologically active compounds never reported in other types of Brazilian propolis. The consistent literature data demonstrate that propolis may be beneficial for human health. In previous studies, the effect of powered propolis extract in humans was investigated. The consumption of propolis as a nutritional supplement showed a decrease in free radical-induced lipid peroxidation, as well as an increase in activity of superoxide dismutase [21]. In addition, propolis exhibited significant anti-inflammatory effects in experimental models with respect to thoracic capillary vessel leakage in mice, as well as in carrageenan-induced oedema, carrageenan-induced pleurisy and acute lung damage in rats [22].

The cardioprotective effects of propolis extracts have been reported, but the mechanism of action of its polyphenols is not well defined [22,23]. Despite extensive research on the effects of propolis, there are no data concerning the *in vivo* action of propolis on atherogenic and angiogenic processes in atherosclerosis. To better understand the impact of polyphenols from propolis in atherosclerotic lesion formation and angiogenic factors, LDL receptor gene knockout mice (LDLr^{-/-}) were fed with diets rich in saturated fat and cholesterol to investigate the effects of propolis polyphenols on serum lipid profile, atherogenesis, atherosclerosis progression, and inflammatory and angiogenic gene expression in atherosclerotic lesions.

2. Materials and methods

2.1. Propolis samples and extraction of polyphenols

The three following types of propolis were used in this study: the green Brazilian propolis, collected at Minas Gerais State, Brazil, where *Baccharis dracunculifolia* DC is the main botanical source [24]; the red Brazilian propolis, collected at Alagoas State, Brazil, where *Dalbergia ecastaphyllum* is the main botanical source [25]; and the brown Chilean propolis, collected in the Araucanía region, Cunco, Chile, where *Lotus uliginosus* is the main botanical source of the propolis.

The propolis samples (100 g) were extracted with 80% ethanol (v/v) (450 ml), incubated in a water bath at 70°C for 30 min and then filtered to obtain the ethanolic extracts of propolis (EEP) [26]. The EEP was passed through an OASIS column (Waters, WAT106202, Ireland), and the polyphenols were eluted with methanol to obtain the polyphenol concentrated solution (PCS). The PCS filtrate was taken to dryness and redissolved in 70% ethanol, resulting in the polyphenol extract of propolis (PEP).

2.2. Total polyphenol content

Total polyphenol content in PEP was determined by the Folin–Ciocalteu colorimetric method according to Ainsworth and Gillespie [27] with minor modifications. Extract aliquots (50 µl) were mixed with 50 µl of the Folin–Ciocalteu reagent (1:10) and 100 µl of 4% Na₂CO₃. The absorbance was measured at 740 nm after 1 h of incubation at room temperature and in the dark. PEP was evaluated at a final

concentration of 500 µg/ml. The total polyphenol contents were expressed as percentages (%) or milligrams per gram (gallic acid equivalents).

2.3. LC-MS Polyphenol analysis

The polyphenols isolated from propolis were characterized by LC-MS analysis (Esquire HCT, Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA). The polyphenols from the green, red and brown propolis were separated using a 150×4.6-mm stainless-steel Synergi 4 Fusion- RP (C18) 80A column. The eluents were (A) 0.25% formic acid and (B) methanol. The separations were performed at room temperature by solvent gradient elution from 0 min using 50% A/50% B to 60 min using 100% B at a flow rate of 0.5 ml/min.

2.4. Animals, chow and experimental design

Homozygous LDL receptor-deficient mice (LDLr^{-/-}, C57BL/6J background) were purchased from Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA). The animals were maintained in individual plastic cages at 22°C on a 12-h light–dark cycle. A total of 150 LDLr^{-/-} mice (n=15 per group, 8 weeks old) were divided into two protocols, with the same five groups in each protocol: control (water), vehicle (5% ethanol), green (250 mg/kg body weight/day of polyphenols from green propolis), red (250 mg/kg body weight per day of polyphenols from red propolis) and brown (250 mg/kg body weight per day of polyphenols from brown propolis). The doses of polyphenols from propolis were normalized for each sample of propolis according to its total polyphenol content. The polyphenols were administered in a single dose per day at a volume of 0.5 ml by gavage. The dose was chosen according to previously described acute toxicity studies [28–31].

The experiments were performed in two protocols with a semisynthetic chow based on a Western-type diet containing 20% fat, 0.5% (w/w) cholesterol (CF, Sigma), 0.5% (w/w) colic acid (RV, Sigma), 16.5% casein, vitamins and minerals, according to the recommendations of AIN-93 [32]. This chow did not contain polyphenols.

In Protocol I, termed initial atherosclerotic lesion (IAL), the animals received the chow for 5 weeks and polyphenol supplementation for 4 weeks before euthanasia (1 week with chow and 4 weeks with supplementation plus chow). In Protocol II, termed advanced atherosclerotic lesion (AAL), the animals received the same chow as IAL for 16 weeks and polyphenol supplementation for the last 4 weeks before euthanasia (12 weeks with chow and 4 weeks with supplementation plus chow). The animals received water and chow *ad libitum* throughout the experiment. The study protocols were approved by the Ethics Committee for Animal Studies of the Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo (protocol number 170/2009) and followed the rules of the Guide for the Care and the Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (NHI Publication N 85-23, revised in 1996). At the end of the experiment and after overnight fasting, the animals were sedated under ketamine (1.0 g/10.0 ml; Vetaset, Fort. Dodge Saúde Animal Ltda, Brazil) and xylazine (2.0 g/100 ml; Bayer do Brasil, Brazil; 2:1) anesthesia before euthanasia.

2.5. Biochemical analysis

Blood was drawn by cardiac puncture in dry tubes, and the serum was separated for further biochemical analyses. Triacylglycerols (TAG), total cholesterol (TC) and high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) were determined using commercial kits (LABTEST, Rio de Janeiro, RJ, Brazil). Non-HDL cholesterol was calculated as the difference between TC and HDL-C [33]. Non-HDL-cholesterol provides a single index of all the atherogenic apo B-containing lipoproteins, i.e., LDL, VLDL, IDL and lipoprotein (a).

2.6. Preparation of histological sections and measurement of atherosclerotic lesion area

The heart was perfused with phosphate buffered saline (PBS) and then with 10% PBS-buffered formaldehyde. The heart and aorta were excised, fixed in 10% formaldehyde for at least 2 days and then embedded in 5%, 10% and 25% gelatin and

Table 2
Total polyphenol content and major components of PEP

Samples	Polyphenol content (%)	Major components
Green	31.5±2.6	Artepelin C, pinocembrin, kampferol
Red	30.6±2.9	3-Hydroxy-8,9-dimethoxypterocarpan, medicarpin, daidzein
Brown	34.4±1.7	Pinocembrin, caffeic acid phenyl ester, quercetin, galangin

The EEP samples were eluted from an OASIS column (Waters, WAT106202, Ireland) with methanol. The polyphenol concentrated solution filtrate was taken to dryness and redissolved in ethanol 70% resulting in the polyphenol extract of propolis. The polyphenols isolated from propolis were characterized by LC-MS analysis. The eluents were (A) 0.25% formic acid and (B) methanol. The separations were performed at room temperature by solvent gradient elution from 0 min using 50% A/50% B to 60 min using 100% B at a flow rate of 0.5 ml/min.

Table 3
Effects of polyphenols from green, red and brown propolis supplementation on body mass and biochemical profile of LDLr^{-/-} mice

	Experimental protocols									
	IAL (groups)					AAL (groups)				
	Control (n=13)	Vehicle (n=12)	Green (n=14)	Red (n=15)	Brown (n=11)	Control (n=13)	Vehicle (n=13)	Green (n=10)	Red (n=11)	Brown (n=12)
Initial BM (g)	26±1.6	25.8±0.9	26.2±1.3	26.1±0.8	25.9±1.5	25.9±0.8	26.1±0.6	26.4±1.3	25.8±0.7	26.2±1.4
Final BM (g)	32±1.7	32.4±1.3	30.9±0.9	30.8±1.8	31±0.6	47.1±2.3	47.4±1.9	45.6±2.7	45.1±1.1	44.9±1.4
Chow intake (g/day)	3.4±0.6	3.2±0.7	3.4±0.5	3.0±0.3	3.4±0.8	3.8±0.4	3.6±0.6	3.9±0.9	3.5±0.2	3.4±0.9
TAG (mg/dl)	478±139	450±48	363±79	266±60 ^a	347±51	456±69	377±96	275.5±22	211.1±55 ^a	305±29
TC (mg/dl)	1942±139	2048±89	2096±60	1620±81 ^a	2084±68	1920±158	2271±253	2030±55	1750±64 ^a	2069±119
HDL-C (mg/dl)	25±5	24±3	37±5 ^b	42±8 ^a	36±2 ^b	26±5	26±6	22±3	34±5 ^a	20±1.2
Non-HDL-C (mg/dl)	1917±141	2025±201	2072±198	1585±172 ^a	2055±201	1873±169	2244±252	1908±56	1816±67	2049±107

BM, Body mass; IAL, animals were feed with a Western-type diet during 5 weeks and they received a respective polyphenol supplementation (green, red and brown; 250 mg/kg per day) for 4 weeks before the euthanasia; AAL, animals were feed with a Western-type diet during 16 weeks and they received a respective polyphenol supplementation (green, red and brown; 250 mg/kg per day) for 4 weeks before the euthanasia.

^a $P<0.05$.

^b $P<0.01$ vs. control group.

fixed in mounting medium (Tissue-Tek OTC compound, Sakura Finetek, USA). The aortic root at the heart was sectioned proximally to distally in 10- μ m-thick slices starting from the semilunar valves. The area of the atherosclerotic lesion was reported as the sum of the lesions in six equidistant sections (80 μ m) along an aortic root length of 400 μ m. The results from the five mice/group protocols are reported as mean square micrometer $\pm$ S.D. To quantify the cross-sectional area of the oil red O-stained lesions in the aortic root, the processing and staining were carried out as described [34] and the images were analyzed using the Image-Pro Plus software (version 3.0; Media

Cybernetics, USA). All analyses were double blind and were carried out independently by two observers.

2.7. Quantitative real-time polymerase chain reaction

mRNA was extracted from an atherosclerotic lesion area using the TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Single-strand cDNA was synthesized from RNA using a high-capacity cDNA reverse transcription kit according to the manufacturer's

Fig. 1. Impact of polyphenols from propolis oral supplementation (250 mg/kg per day) on the extent of atherosclerosis LDLr^{-/-} mice in (A) initial atherosclerosis lesion (IAL) and (B) advanced atherosclerotic lesion (AAL) in the aortic sinus. Representative sections of the aortic sinus from the control, vehicle, green, red and brown groups are shown. Average $\pm$ S.D. of lesion area for IAL (C) and AAL (D) are represented.

instructions (Applied Biosystems). Primers for CD36, IL-6, ABCA1, MCP-1, INF γ , TGF β , HO-1, VCAM, ANG I, ANG II, VEGF, FGF, MMP-2, MMP-9, PDGF, TIMP-1, PECAM and 18S (Table 1) were designed using Primer Express version 2.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The data were normalized against the ribosomal protein 18S housekeeping gene. The primer amplification efficiency and specificity were verified for each set of primers. The cDNA levels of the target genes were measured using the power SYBR green master mix in a real-time PCR 7500 machine (Applied Biosystems). The RT-PCR reaction conditions were as follows: 95°C for 10 min, 40 cycles of 95°C for 15 s, 60°C for 1 min and 1 cycle of dissociation stage. The mRNA fold change was calculated using the 2^{-(Delta Delta C(T))} method [35].

2.8. Immunohistochemical analysis

To evaluate the expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) and platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM-1), the remaining aortic arch atheromatous lesion sections were mounted with Tissue-Tek OTC and embedded in paraffin. VCAM-1 and PECAM were detected with the respective anti-mouse antibodies H-276 (1:400) and ER-MP12 (1:400) purchased from Santa Cruz Biotechnology (USA). The VCAM-1 and PECAM-1 staining was quantified using image analysis software (KS300, Kontron, Germany). Histochemical analysis of the atheromatous lesion was performed in 5- μ m-thick tissue sections stained with Harris hematoxylin.

2.9. Statistical analysis

Statistical analysis was performed with the use of SPSS software (version 12.0; SPSS, Chicago, IL, USA) for the Mac. Results are reported as means $\pm$ S.D. Shapiro–Wilk

test showed non-normal distribution of data for all parameters. The statistical significance of experimental observations was determined by one-way analysis of variance followed by the Kruskal–Wallis test. With five animals per group, our study had >95% power to detect a 50% decrease in aortic lesion from five animals per group. Statistical significance was accepted at a value of $P < .05$.

3. Results

3.1. Total polyphenol content of propolis extracts and LC-MS analysis

The total polyphenol content in PEP for all types of propolis is shown in Table 2. The brown propolis presented a slightly higher but not significantly different concentration of polyphenols when compared to the green and red propolis. The average content of total polyphenols in all types of propolis was 32%. Although the samples contained a similar amount of total polyphenols, the variety of polyphenol types differed from one propolis to another. As described in Table 2, the major components found in the extract from the red propolis were characterized as isoflavonoids and pterocarpanes. The polyphenols from the brown propolis were constituted by many types of flavonoids and phenolic acid esters. In contrast, the major components in the green propolis of Brazilian origin were terpenoids and prenylated derivatives of *p*-coumaric acids.

Fig. 2. Effect of propolis polyphenol supplementation on atherogenic gene expression by quantitative real-time RT-PCR in the IAL. The relative mRNA expression of CD36, IL-6, ABCA1, MCP-1, INF γ , TGF β , HO-1 and VCAM was monitored. LDLr^{-/-} mice were fed a Western-type diet chow without polyphenols during 1 week; after this period, polyphenols were supplemented (250 mg/kg per day) with the respective propolis types (green, red or brown) for 4 weeks. The control and placebo-treated mice received only water and water with 5% ethanol, respectively. The real-time PCR results are shown (fold induction vs. control animals, corrected for the 18S expression, mean $\pm$ S.D.; * $P < .05$ vs. control).

219 3.2. Chow intake, body weight and lipid profile

220 The daily food intake did not differ among the groups (green, red
221 and brown) in the IAL and AAL protocols. At the end of the
222 experiment, no significant differences in weight gain were observed
223 among the five groups in both protocols (Table 3).

224 3.3. Effects of polyphenols from propolis on lipid profile

225 In the IAL protocol, the plasma TAG, TC, HDL-C and non-HDL-C
226 levels were significantly different among the groups (Table 3).
227 Compared to the controls, the TAG, TC and non-HDL-C levels were
228 lower in mice treated with the red propolis polyphenols. In fact, the
229 levels of non-HDL-C were lower in all groups supplemented with
230 polyphenols when compared to control, although mice supplemented
231 with the red propolis polyphenols showed lower non-HDL-C than
232 those that received polyphenols from the green and brown propolis.
233 In the AAL protocol, only the polyphenols from the red propolis
234 promoted a significant decrease in TAG (45%) and TC (22%) and
235 increased HDL-C (30%) levels compared to control.

3.4. Effect of polyphenols on atherosclerosis progression

237 Morphometric analysis of atherosclerotic lesions in the IAL
238 protocol (Fig. 1A) showed that the lesion area in the aortic sinus
239 was reduced ($P<0.05$) following treatment with green, brown and red
240 propolis polyphenols by 34%, 37% and 57%, respectively, compared to
241 control animals. The most effective lesion area reduction was
242 observed in the red propolis group ($P<0.01$) (Fig. 1C). In the AAL
243 protocol (Fig. 1B), no difference was observed either in the green or in
244 the brown propolis polyphenol-treated groups when compared to the
245 control. However, the red propolis group showed a significant
246 reduction (30%, $P<0.05$) of the atherosclerotic lesion area when
247 compared to control (Fig. 1D).

3.5. Gene expression in atherosclerotic lesion

249 To investigate how the polyphenols, especially those from the red
250 propolis, attenuate the progression of atherosclerotic lesions, the
251 expression of the genes involved in the atherosclerotic process was
252 evaluated. Moreover, we also investigated whether polyphenols from

Fig. 3. Effect of propolis polyphenol supplementation on atherogenic gene expression by quantitative real-time RT-PCR in AAL. The relative mRNA expression of CD36, IL-6, ABCA1, MCP-1, INFγ, TGFβ, HO-1 and VCAM was monitored. LDLr^{-/-} mice were fed a Western-type diet chow without polyphenols during 12 weeks; after this period, polyphenols were supplemented (250 mg/kg per day) with the respective propolis types (green, red or brown) for 4 weeks. The control and placebo-treated mice received only water and water with 5% ethanol, respectively. The real-time PCR results are shown (fold induction vs. control animals, corrected for the 18S expression, mean±S.D.; * $P<0.05$ vs. control).

propolis could modulate the expression of genes involved in angiogenesis in the atherosclerotic lesions. In the IAL protocol, polyphenols from green, red and brown propolis decreased MCP-1, INF γ , IL6, CD36 and TGF β mRNA expression (Fig. 2) compared to the expression in the control group ($P<0.05$). Only the polyphenols from red and brown propolis decreased VCAM mRNA expression ($P<0.05$). Additionally, the group treated with polyphenols from red propolis showed the lowest expression ($P<0.01$) of IL-6 and CD36 mRNA compared to the other groups. In all the experimental groups (green, red and brown), the expression of HO-1 and ABCA1 ($P<0.05$) was higher compared to the control group. As for the IAL protocol, in the AAL studies, all the experimental groups induced the down-regulation of MCP-1, INF γ and IL-6 gene expression (mRNA) compared to the control (Fig. 3). However, a down-regulation of CD36 gene expression was observed only for the group supplemented with polyphenols from the red propolis.

We further investigated the expression of angiogenesis regulator genes, angiopoietin I, angiopoietin II, VEGF, FGF, MMP-2, MMP-9, PDGF, TIMP-1 and PECAM. In the IAL protocol, angiopoietin I, angiopoietin II, VEGF, FGF, MMP-9, PDGF and PECAM gene expression was significantly down-regulated upon supplementation with polyphenols from the green, red and brown propolis (Fig. 4) compared to control; in addition, the animals in this protocol displayed an up-regulation of TIMP1 and did exhibit MMP2 expression compared to the control group (Fig. 5). In the AAL protocol, VEGF, MMP9, PDGF and PECAM expression was negatively modulated by polyphenols from the green, red and brown propolis in comparison to controls.

However, only the polyphenols from the red propolis were able to increase TIMP1 gene expression (Fig. 5).

3.6. PECAM and VCAM protein expression in atherosclerotic lesion

The atherosclerotic lesions of the aortic valve sinus from LDLr $^{-/-}$ mice treated with the polyphenol extracts from the three types of propolis were utilized to evaluate the expression of VCAM-1 and PECAM-1 by immunohistochemistry (Fig. 6). The results showed that, in the IAL protocol, a decreased expression ($P<0.05$) of PECAM-1 and VCAM-1 protein occurred in all groups supplemented with polyphenols. Furthermore, the lowest PECAM-1 expression was found in the groups supplemented with polyphenols from the red and brown propolis compared to other groups ($P<0.01$); the lowest VCAM-1 expression ($P<0.01$) was observed in the group supplemented with polyphenols from the red propolis (Fig. 6). In the AAL protocol, supplementation with polyphenols from the three types of propolis reduced ($P<0.05$) the expression of PECAM-1 and VCAM in comparison to controls. Additionally, lower VCAM-1 expression was seen in the groups treated with polyphenols from the red and brown propolis ($P<0.01$) than in those treated with the green propolis (Fig. 6).

4. Discussion

Propolis is a natural compound rich in polyphenols that is commonly used in alternative medicine. This study demonstrates that polyphenols from propolis inhibited atherosclerosis progression

Fig. 4. Impact of propolis polyphenol supplementation on angiogenic gene expression by quantitative real-time RT-PCR in IAL. The relative mRNA expression of ANG I, ANG II, VEGF, FGF, MMP-2, MMP-9, PDGF, TIMP-1 and PECAM was monitored. LDLr $^{-/-}$ mice were fed a Western-type diet chow without polyphenols during 1 week; after this period, polyphenols were supplemented (250 mg/kg per day) with the respective propolis types (green, red or brown) for 4 weeks. The control and placebo-treated mice received only water and water with 5% ethanol, respectively. The real-time PCR results are shown (fold induction vs. control animals, corrected for the 18S expression, mean $\pm$ S.D.; * $P<0.05$ vs. control).

Fig. 5. Impact of propolis polyphenol supplementation on angiogenic gene expression by quantitative real-time RT-PCR in AAL. The relative mRNA expression of ANG I, ANG II, VEGF, FGF, MMP-2, MMP-9, PDGF, TIMP-1 and PECAM was monitored. LDLr^{-/-} mice were fed a Western-type diet chow without polyphenols during 12 weeks; after this period, polyphenols were supplemented (250 mg/kg per day) with the respective propolis types (green, red or brown) for 4 weeks. The control and placebo-treated mice received only water and water with 5% ethanol, respectively. The real-time PCR results are shown (fold induction vs. control animals, corrected for the 18S expression, mean±S.D.; *P<.05 vs. control).

in LDLr^{-/-} mice by improving the lipid profile and down-regulating pro-inflammatory cytokines, chemokines and angiogenic factors.

The biological effects of three different types of propolis with distinct polyphenol composition were evaluated in this study. The Brazilian red propolis was characterized by a high content of isoflavones such as medicarpin, homoterocarpin and pterocarpan. A previous study demonstrated that this type of propolis presented a composition similar to a specific type of Cuban red propolis in which no benzophenones were detected [26]. In contrast, several studies have established that artepillin C is the major constituent of green propolis [36,37]. In this study, we found that the major components of green propolis were terpenoids and prenylated derivatives of *p*-coumaric acids. Finally, the Chilean brown propolis has been characterized mainly by the presence of phenolic compounds, as previously reported by Russo et al. [38] and Munoz et al. [39]. Although the three types of propolis presented a similar amount of total polyphenol, their impact on the AALs or IALs was more associated with their specific polyphenol composition.

The dose of polyphenols chosen for this study is supported by previous reports [29,40] demonstrating that 250 mg of polyphenols from propolis per kilogram per day has no toxic effects and is an effective dose for studies with mice. In the present study, for both protocols, IAL or AAL, the LDLr^{-/-} mice received polyphenol supplementation during 4 weeks. Recent reports using polyphenols from different sources have shown that supplementation during 4 to 6 weeks is able to induce protective effects in several pathological conditions in mice [29,41,42].

It is well known that modification of the lipid profile is highly associated with cardiovascular diseases [43–45]. Analysis of blood plasma lipids revealed that all EEPs diminished total cholesterol and elevated HDL-cholesterol concentrations in LDLr^{-/-} mice of the IAL protocol. Our results corroborated previous studies that demonstrated the regulation of lipid metabolism by propolis from different sources [46–48]. Because increased ABCA1 expression is associated with increased HDL levels [49], the ABCA1 up-regulation observed in this study might be one of the mechanisms by which the three EEPs studied here improved the lipid profile. Interestingly, regarding the other biochemical analyses, our study did not show any significant differences among the control, IAL and AAL groups. However, the AAL group showed either higher body weight or larger atherosclerotic lesion area than controls. According to Schreyer et al. [50], the loss of LDLr induces hyperleptinemia that increases the sites of lipid deposition, mainly as visceral and subcutaneous fat, in detriment of high levels of lipids in blood.

Considering the association between atherosclerosis and lipid profile abnormalities, it is reasonable to assume that if polyphenols from propolis could affect blood lipids, they might have effects on the prevention and development of atherosclerotic lesions. In fact, our results demonstrated that treatment of mice with EEP from all three types of propolis promoted a decrease in atherosclerotic lesion areas in the IAL group compared to the controls. Conversely, only polyphenols from the red propolis attenuated the progression of atherosclerosis in mice of the AAL group.

Fig. 6. The vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) and platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM-1) proteins were evaluated in aortic arch atheromatous lesion sections of IALs and AALs. The animals received oral polyphenol supplementation (250 mg/kg per day) with the respective propolis types (green, red or brown) for 4 weeks. The control and placebo-treated mice received only water and water with 5% ethanol, respectively.

The development of atherosclerotic lesions has been related to the expression of CD36, a multiligand scavenger receptor responsible for the recognition and internalization of oxidatively modified LDL, which leads to foam cell formation and atherosclerosis [51]. Thus, CD36 and foam cells are well-known targets for therapeutic interventions in atherosclerosis [52]. Interestingly, only the polyphenols from red propolis were able to down-regulate CD36 expression in animals with advanced lesions. In contrast, all EEPs induced a decrease in atherosclerotic lesion area which was associated with diminished CD36 expression in the IAL group.

As atherosclerosis is defined as a chronic inflammatory disease [53], cytokines play a key role in amplifying the local inflammatory response and favoring the progression of atherosclerotic lesions. In this study, we analyzed whether the atheroprotective effects of EEPs were related to the inflammatory response. Evaluation of the pro-inflammatory profile demonstrated that all EEPs studied here were capable of modulating the expression of pro-inflammatory cytokines such as MCP-1, IFN- γ and IL-6 in both IAL and AAL

groups. In addition, the expression of HO-1, which is an adaptive molecule in the inflammatory repair process [54], was up-regulated by EEPs. However, the down-regulation of TGF- β and VCAM-1 expression was only observed by the EEP treatment in the IAL group. These data are of particular interest because VCAM-deficient mice show at present fewer early atherosclerotic lesions compared to the wild-type mice, indicating a key role of VCAM-1 in the initiation of plaque development [55]. Together with TGF- β , which has a strong profibrogenic effect [56], the down-regulation of VCAM expression may be the key factor for the inhibition of the IALs observed in this study.

The angiogenic process is a critical feature of atherosclerotic plaque development. Moreover, atherosclerotic lesions are highly vascularized when compared to normal vessel tissues [57]. In fact, our findings demonstrated that PECAM, a marker of endothelial cells, was down-regulated by EEPs in both models, suggesting a diminished presence of endothelial cells in atherosclerotic lesions. Similarly, the two major angiogenic biomarkers, VEGF and PDGF, which are

responsible for the migration and proliferation of endothelial cells [58,59], were also down-regulated by EEPs in the initial and advanced lesions. In contrast, EEP treatment was able to modulate the expression of angiopoietin and FGF only in mice of the IAL group compared to controls.

Other crucial angiogenic biomarkers in atherosclerosis are the metalloproteases (MMPs), which degrade most of the extracellular matrix and also induce an increase in arterial stiffness and angiogenesis [60]. In fact, MMP9 expression was significantly down-regulated by EEP treatment in both IAL and AAL groups in comparison to controls. The expression of TIMP-1, an MMP inhibitor, was also evaluated in this study. Although TIMP-1 expression was elevated by EEP treatment in lesions of mice from the IAL group, only the polyphenols from red propolis had this same effect in the AAL group. Therefore, we can speculate that the stronger effect of red propolis polyphenols on angiogenic biomarkers can be reflected in the decreased atherosclerotic lesion area promoted by this type of propolis.

Taken together, our findings demonstrated the potential of polyphenols from propolis not only as preventive agents but also as nutritional therapeutic components against the progression of atherosclerosis. Polyphenols from propolis, particularly those from red propolis, may have beneficial actions for preventing or reducing atherosclerotic lesions through modulation of inflammatory and angiogenic factors.

Acknowledgments

We are grateful to FAPESP (grant to D.S.P.A. and scholarship to J.B.D.) and also to Maurício dos Santos and Renata Ikegam for their technical assistance in the biochemical and immunohistochemical analysis, respectively.

References

- [1] Mach F, Schönbeck U, Sukhova GK, Atkinson E, Libby P. Reduction of atherosclerosis in mice by inhibition of CD40 signalling. *Nature* 1998;394(6689):200–3.
- [2] Basu A, Penugonda K. Pomegranate juice: a heart-healthy fruit juice. *Nutr Rev* 2009;67(1):49–56.
- [3] Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature* 2000;407(6801):233–41.
- [4] Lindner JR. Molecular imaging of cardiovascular disease with contrast-enhanced ultrasonography. *Nat Rev Cardiol* 2009;6(7):475–81.
- [5] Slevin M, Kumar P, Gaffney J, Kumar S, Krupinski J. Can angiogenesis be exploited to improve stroke outcome? Mechanisms and therapeutic potential. *Clin Sci* 2006;111:171–83.
- [6] Doyle B, Caplice N. Plaque neovascularization and antiangiogenic therapy for atherosclerosis. *Am Coll Cardiol* 2007;49:2073–80.
- [7] Herrmann J, Lerman LO, Mukhopadhyay D, Napoli C, Lerman A. Angiogenesis in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:1948–57.
- [8] Fishbein MC. The vulnerable and unstable atherosclerotic plaque. *Cardiovasc Pathol* 2010;19(1):6–11.
- [9] Sforzin JM. Propolis and the immune system: a review. *J Ethnopharmacol* 2007;113(1):1–14.
- [10] Salatino A, Teixeira EW, Negri G, Message D. Origin and chemical variation of Brazilian propolis. *Evid Based Complement Alternat Med* 2005;2(1):33–8.
- [11] da Silva Filho AA, de Sousa JP, Soares S, Furtado NA, Andrade e Silva ML, Cunha WR, et al. Antimicrobial activity of the extract and isolated compounds from *Baccharis dracunculifolia* D. C. (Asteraceae). *Z Naturforsch C* 2008;63(1–2):40–6.
- [12] Libério SA, Pereira AL, Araújo MJ, Dutra RP, Nascimento FR, Monteiro-Neto V, et al. The potential use of propolis as a cariostatic agent and its actions on mutans group streptococci. *J Ethnopharmacol* 2009;125(1):1–9.
- [13] Cuesta-Rubio O, Piccinelli AL, Fernandez MC, Hernández IM, Rosado A, Rastrelli L. Chemical characterization of Cuban propolis by HPLC-PDA, HPLC-MS, and NMR: the brown, red, and yellow Cuban varieties of propolis. *J Agric Food Chem* 2007;55(18):7502–9.
- [14] Piccinelli AL, Campone L, Dal Piaz F, Cuesta-Rubio O, Rastrelli L. Fragmentation pathways of polycyclic polyisoprenylated benzophenones and degradation profile of nemorosone by multiple-stage tandem mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* 2009;20(9):1688–98.
- [15] Popolo A, Piccinelli LA, Morello S, Cuesta-Rubio O, Sorrentino R, Rastrelli L, et al. Antiproliferative activity of brown Cuban propolis extract on human breast cancer cells. *Nat Prod Commun* 2009;4(12):1711–6.

- [16] Fonseca YM, Marquele-Oliveira F, Vicentini FT, Furtado NA, Sousa JP, Lucisano-Valim YM, Fonseca MJ. Evaluation of the potential of Brazilian propolis against UV-induced oxidative stress. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2011; 2011.pii: 863917.
- [17] Simões-Ambrosio LM, Gregório LE, Sousa JP, Figueiredo-Rinhel AS, Azzolini AE, Bastos JK, et al. The role of seasonality on the inhibitory effect of Brazilian green propolis on the oxidative metabolism of neutrophils. *Fitoterapia* 2010;81(8):1102–8.
- [18] Vervelle A, Mouhyi J, Del Corso M, Hippolyte MP, Sammartino G, Dohan Ehrenfest DM. Mouthwash solutions with microencapsulated natural extracts: efficiency for dental plaque and gingivitis. *Rev Stomatol Chir Maxillofac* 2010;111(3):148–51.
- [19] Parreira NA, Magalhães LG, Moraes DR, Caixeta SC, de Sousa JP, Bastos JK, et al. Antiprotozoal, schistosomicidal, and antimicrobial activities of the essential oil from the leaves of *Baccharis dracunculifolia*. *Chem Biodivers* 2010;7(4):993–1001.
- [20] Alencar SM, Oldoni TL, Castro ML, Cabral IS, Costa-Neto CM, Cury JA, et al. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. *J Ethnopharmacol* 2007;113(2):278–83.
- [21] Jasprica I, Mornar A, Debeljak Z, Smolčić-Bubalo A, Medić-Sarić M, Mayer L, et al. In vivo study of propolis supplementation effects on antioxidative status and red blood cells. *J Ethnopharmacol* 2007;110(3):548–54.
- [22] Hu F, Hepburn HR, Li Y, Chen M, Radloff SE, Daya S. Effects of ethanol and water extracts of propolis (bee glue) on acute inflammatory animal models. *J Ethnopharmacol* 2005;100(3):276–83.
- [23] Rocha KK, Souza GA, Ebaïd GX, Seiva FR, Cataneo AC, Novelli EL. Resveratrol toxicity: effects on risk factors for atherosclerosis and hepatic oxidative stress in standard and high-fat diets. *Food Chem Toxicol* 2009;47(6):1362–7.
- [24] Gerber M, Boutron-Ruault MC, Hercberg S, Riboli E, Scalbert A, Siess MH. Food and cancer: state of the art about the protective effect of fruits and vegetables. *Bull Cancer* 2002(3):293–312.
- [25] Kumazawa S, Yoneda M, Shibata I, Kanaeda J, Hamasaka T, Nakayama T. Direct evidence for the plant origin of Brazilian propolis by the observation of honeybee behavior and phytochemical analysis. *Chem Pharm Bull* 2003;51(6):740–2.
- [26] Dausch A, Moraes CS, Fort P, Park YK. Brazilian red propolis—chemical composition and botanical origin. *Evid Based Complement Altern Med* 2008;5(4):435–41.
- [27] Ainsworth EA, Gillespie KM. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. *Nat Protoc* 2007;2(4):875–7.
- [28] Pereira AD, de Andrade SF, de Oliveira Swerts MS, Maistro EL. First in vivo evaluation of the mutagenic effect of Brazilian green propolis by comet assay and micronucleus test. *Food Chem Toxicol* 2008;46(7):2580–4.
- [29] Moura AC, Perazzo FF, Maistro EL. The mutagenic potential of *Clusia alata* (Clusiaceae) extract based on two short-term in vivo assays. *Genet Mol Res* 2008;7(4):1360–8.
- [30] Barros MP, Lemos M, Maistro EL, Leite MF, Sousa JP, Bastos JK, et al. Evaluation of antitumor activity of the main phenolic acids found in Brazilian green propolis. *J Ethnopharmacol* 2008;120(3):372–7.
- [31] Büyükerber M, Savaş MC, Bağcı C, Koruk M, Gülşen MT, Tutar E, et al. The beneficial effect of propolis on cerulein-induced experimental acute pancreatitis in rats. *Turk J Gastroenterol* 2009;20(2):122–8.
- [32] Reeves PG, Nielsen FH, Fahey Jr GC. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 1993;123(11):1939–51.
- [33] Dorfman SE, Wang S, Vega-López S, Jauhainen M, Lichtenstein AH. Dietary fatty acids and cholesterol differentially modulate HDL cholesterol metabolism in Golden-Syrian hamsters. *J Nutr* 2005;135(3):492–8.
- [34] Paigen B, Morrow A, Holmes PA, Mitchell D, Williams RA. Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice. *Atherosclerosis* 1987;68:231–40.
- [35] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{−(delta delta c t)} method. *Methods* 2001;25:402–8.
- [36] Nakanishi I, Uto Y, Ohkubo K, Miyazaki K, Yakumaru H, Urano S, et al. Efficient radical scavenging ability of artemisinin C, a major component of Brazilian propolis, and the mechanism. *Org Biomol Chem* 2003;1(9):1452–4.
- [37] Nakajima Y, Tsuruma K, Shimazawa M, Mishima S, Hara H. Comparison of bee products based on assays of antioxidant capacities. *BMC Complement Altern Med* 2009;9:4.
- [38] Russo A, Cardile V, Sanchez F, Troncoso N, Vanella A, Garbarino JA. Chilean propolis: antioxidant activity and antiproliferative action in human tumor cell lines. *Life Sci* 2004;76(5):545–58.
- [39] Munoz O, Pena RC, Ureta E, Montenegro G, Timmermann BN. Propolis from Chilean matorral hives. *Z Naturforsch* 2001;56(3–4):269–72.
- [40] El-Sayed elSM, Abo-Salem OM, Aly HA, Mansour AM. Potential antidiabetic and hypolipidemic effects of propolis extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Pak J Pharm Sci* 2009;22(2):168–74.
- [41] Luo QF, Sun L, Si JY, Chen DH. Hypocholesterolemic effect of stilbenes containing extract-fraction from *Cajanus cajan* L. on diet-induced hypercholesterolemia in mice. *Phytomedicine* 2008;15:932–9.
- [42] Lee MS, Kim CT, Kim Y. Green tea (−)-epigallocatechin-3-gallate reduces body weight with regulation of multiple genes expression in adipose tissue of diet-induced obese mice. *Ann Nutr Metab* 2009;54(2):151–7.
- [43] González-Santiago M, Martín-Bautista E, Carrero JJ, Fonollá J, Baró L, Bartolomé MV, et al. One-month administration of hydroxytyrosol, a phenolic antioxidant present in olive oil, to hyperlipemic rabbits improves blood lipid profile,

- antioxidant status and reduces atherosclerosis development. *Atherosclerosis* 2006;188(1):35–42.
- [44] Amarenco P, Labreuche J, Touboul PJ. High-density lipoprotein-cholesterol and risk of stroke and carotid atherosclerosis: a systematic review. *Atherosclerosis* 2008;196(2):489–96.
- [45] Kramer MK, Kriska AM, Venditti EM, Miller RG, Brooks MM, Burke LE, et al. Translating the Diabetes Prevention Program: a comprehensive model for prevention training and program delivery. *Am J Prev Med* 2009;37(6):505–11.
- [46] Koya-Miyata S, Arai N, Mizote A, Taniguchi Y, Ushio S, Iwaki K, et al. Propolis prevents diet-induced hyperlipidemia and mitigates weight gain in diet-induced obesity in mice. *Biol Pharm Bull* 2009;32(12):2022–8.
- [47] Nader MA, el-Agamy DS, Suddek GM. Protective effects of propolis and thymoquinone on development of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Arch Pharm Res* 2010;33(4):637–43.
- [48] Ichi I, Hori H, Takashima Y, Adachi N, Kataoka R, Okihara K, et al. The beneficial effect of propolis on fat accumulation and lipid metabolism in rats fed a high-fat diet. *J Food Sci* 2009;74(5):H127–31.
- [49] Chung S, Timmins JM, Duong M, Degirolamo C, Rong S, Sawyer JK, et al. Targeted deletion of hepatocyte ABCA1 leads to very low density lipoprotein triglyceride overproduction and low density lipoprotein hypercatabolism. *J Biol Chem* 2010;285(16):12197–209.
- [50] Schreyer SA, Vick C, Lystig TC, Mystkowski P, LeBoeuf RC. LDL receptor but not apolipoprotein E deficiency increases diet-induced obesity and diabetes in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002;282(1):E207–14.
- [51] Febbraio M, Podrez EA, Smith JD, Hajjar DP, Hazen SL, Hoff HF, et al. Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice. *J Clin Invest* 2000;105(8):1049–56.
- [52] Li AC, Brown KK, Silvestre MJ, Willson TM, Palinski W, Glass CK. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands inhibit development of atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *J Clin Invest* 2000;106(4):523–31.
- [53] Packard RRS, Libby P. Inflammation in atherosclerosis: from vascular biology to biomarker discovery and risk prediction. *Clin Chem* 2008;54:24–38.
- [54] Song J, Sumiyoshi S, Nakashima Y, Doi Y, Iida M, Kiyohara Y, et al. Overexpression of heme oxygenase-1 in coronary atherosclerosis of Japanese autopsies with diabetes mellitus: Hisayama study. *Atherosclerosis* 2009;202(2):573–81.
- [55] Cybulsky MI, Iiyama K, Li H, Zhu S, Chen M, Iiyama M, et al. A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *J Clin Invest* 2001;107(10):1255–62.
- [56] Leonarduzzi G, Sevanian A, Sottero B, Arkan MC, Biasi F, Chiarotto E, et al. Up-regulation of the fibrogenic cytokine TGF-beta1 by oxysterols: a mechanistic link between cholesterol and atherosclerosis. *FASEB J* 2001;15(9):1619–21.
- [57] Sirol M, Moreno PR, Purushothaman KR, Vucic E, Amirbekian V, Weinmann HJ, et al. Increased neovascularization in advanced lipid-rich atherosclerotic lesions detected by gadofluorine-M-enhanced MRI: implications for plaque vulnerability. *Circ Cardiovasc Imaging* 2009;2(5):391–6.
- [58] Inoue M, Itoh H, Ueda M, Naruko T, Kojima A, Komatsu R, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in human coronary atherosclerotic lesions: possible pathophysiological significance of VEGF in progression of atherosclerosis. *Circulation* 1998;98(20):2108–16.
- [59] Wågsäter D, Zhu C, Björck HM, Eriksson P. Effects of PDGF-C and PDGF-D on monocyte migration and MMP-2 and MMP-9 expression. *Atherosclerosis* 2009;202(2):415–23.
- [60] Chung AW, Yang HH, Sigrist MK, Brin G, Chum E, Gourlay WA, et al. Matrix metalloproteinase-2 and -9 exacerbate arterial stiffening and angiogenesis in diabetes and chronic kidney disease. *Cardiovasc Res* 2009;84(3):494–504.

AUTHOR QUERY FORM

ELSEVIER	Journal: JNB Article Number: 6689	Please e-mail or fax your responses and any corrections to: Jill Shepherd E-mail: J.Shepherd@Elsevier.com Tel: 352-483-8113 Fax: 352-483-3417
---	--	---

Dear Author,

Any queries or remarks that have arisen during the processing of your manuscript are listed below and highlighted by flags in the proof. Please check your proof carefully and mark all corrections at the appropriate place in the proof (e.g., by using on-screen annotation in the PDF file) or compile them in a separate list.

For correction or revision of any artwork, please consult <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Any queries or remarks that have arisen during the processing of your manuscript are listed below and highlighted by flags in the proof. Click on the 'Q' link to go to the location in the proof.

Location in article	Query / Remark: click on the Q link to go Please insert your reply or correction at the corresponding line in the proof
Q1	Please check whether this should be 'LDLr function' or 'LDLr activity'.
Q2	Ref. 54 was not cited. The original Ref. 55 here was changed to Ref. 54. Please check.
Q3	Please indicate the level for the double asterisk if necessary.

Thank you for your assistance.

ANEXO 5

Artigo submetido e em análise para publicação no *The Journal of Nutrition*

THE JOURNAL OF NUTRITION

Official Publication of the American Society for Nutrition

The Journal of Nutrition
NUTRITION/2011/145607
Version 1

Natural red propolis polyphenols suppress angiogenesis by the
induction of von Hippel-Lindau-dependent hypoxia-inducible factor-1
alpha degradation

Julio Beltrame Daleprane, Tobias Schmid, Nathalie Dehne, Martina
Rudnicki, Heidi Menrad, Theresa Geis, Masaharu Ikegaki, Thomas P.
Ong, Bernhard Bruene, and Dulcinea SP Abdalla

This paper includes additional materials for review purposes. To view additional materials, click on the [\[Download Supplemental Files\]](#) link available in the Full MS Info view of the manuscript. To reach this manuscript view, go to <http://submit.nutrition.org>, and log in to your account. Enter the Reviewer Area and click on [Active Reviews](#).

Instructions for Authors: <http://jn.nutrition.org/site/misc/ifora.xhtml>

1 **Natural red propolis polyphenols suppress angiogenesis by the**
2 **induction of von Hippel-Lindau-dependent hypoxia-inducible factor-1**
3 **alpha degradation**^{1,2,3}

4

5 Julio B. Daleprane^{4,5}, Tobias Schmid⁶, Nathalie Dehne⁶, Martina Rudnicki⁵,
6 Heidi Menrad⁶, Theresa Geis⁶, Masaharu Ikegaki⁷, Thomas P. Ong⁴,
7 Bernhard Brüne⁶ and Dulcinea S. P. Abdalla^{5*}.

8

9 ⁴Department of Clinical and Toxicology Analysis, Faculty of Pharmaceutical
10 Sciences, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

11 ⁵Department of Food and Experimental Nutrition, Faculty of Pharmaceutical
12 Sciences, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

13 ⁶Institute of Biochemistry I, Faculty of Medicine, Goethe-University Frankfurt,
14 Theodor-Stern-Kai 7, 60590 Frankfurt, Germany

15 ⁷Department of Pharmacy, Federal University of Alfenas, Alfenas, MG, Brazil

16

17 ³Supplemental Figure 1 is available as Online Supporting Material with the
18 online posting of this paper at <http://jn.nutrition.org>

19

20 RUNNING TITLE: Red propolis polyphenos inhibits angiogenesis

21 WORD COUNT: 6.008, NUMBER OF FIGURES: 5, NUMBER OF TABLES: 0

22 SUPPLEMENTARY MATERIAL: Online Supporting Materials: 1

23 AUTHOR LIST FOR INDEXING: Daleprane, Schmid, Dehne, Rudnicki,
24 Menrad, Geis, Ikegaki, Ong, Brüne and Abdalla

25

26 ¹This work was supported by grants from the Deutsche
27 Forschungsgemeinschaft (Br 999, Excellence Cluster Cardiopulmonary
28 System), the Sander Foundation (to B.B.); the Foundation for Research
29 Support of the State of Sao Paulo - FAPESP-08/53756-7 (to D.S.P.A.) and a
30 student scholarship (FAPESP-08/53755-0 and DAAD-A/09/79914) to J.B.D.

31

32 ²Author disclosure: J.B. Daleprane, T. Schmid, N. Dehne, M. Rudnicki, H.
33 Menrad, T. Geis, M. Ikegaki, T.P. Ong, B. Brüne* and D.S.P. Abdalla have no
34 conflicts of interest.

35

36 *To whom correspondence should be addressed. E-mail: dspa@usp.br

37

38 ⁷Abbreviations used: RPPs, red propolis polyphenols; ECs, endothelial cells;
39 VEGF, vascular endothelial growth factor; HIF-1 α , hypoxia-inducible factor
40 1 α ; pVHL, von Hippel-Lindau protein; EEP, ethanolic extract of propolis;
41 EBs, Embryonic bodies; CHX, cycloheximide; DMOG, dimethyloxallyl-glycine.

42

43

44

45

46

47

48

49 ABSTRACT

50 Polyphenol-enriched fractions from natural sources have been proposed to
51 interfere with angiogenesis. The present study aimed to characterize the
52 molecular mechanisms behind the effects of red propolis polyphenols (RPPs)
53 on endothelial cells (ECs). RPPs affected angiogenesis at various levels by
54 reducing migration and sprouting of ECs, attenuating the formation of new
55 blood vessels and decreasing the differentiation of embryonic stem cells into
56 CD31 positive cells in a spheroid culture. Moreover, RPPs inhibited hypoxia-
57 or DMOG-induced mRNA and protein expression of the crucial angiogenesis
58 promoter vascular endothelial growth factor (VEGF). Under hypoxic
59 conditions, RPPs led to a decrease in hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α)
60 protein accumulation, which caused the decreased VEGF expression. In
61 addition, RPPs reduced the HIF-1 α protein half-life from approximately 58 to
62 38 minutes min under hypoxic conditions. The HIF-1 α half-life reduction arose
63 from the increased von Hippel-Lindau (pVHL)-dependent proteasomal
64 degradation of HIF-1 α . RPPs evoke the downregulation of Cdc42, which
65 causes an increase in pVHL protein for subsequent degradation. In summary,
66 we have elucidated the underlying mechanism for the anti-angiogenic action
67 of RPPs, which acts as an attenuator of HIF-1 α accumulation and HIF-1
68 signaling. Further studies are required, and a detailed determination of its
69 therapeutic value will be possible based on our findings.

70

71

72

73

74 INTRODUCTION

75 Propolis is a natural polyphenol-rich resinous substance collected by
76 honeybees (*Apis mellifera* L.) from a variety of plant sources (1,2). In recent
77 years, propolis has gained popularity as a health drink and also has been
78 used extensively in food and beverages, and is thought to improve human
79 health and to prevent diseases. The beneficial effects for health largely
80 attributed to its polyphenols composition (3,4,5). Indeed, a plethora of
81 experimental evidence demonstrate that a variety of polyphenolic substances,
82 particularly those present in dietary and medicinal plants, have been
83 associated with preventive effects on chronic diseases (6,7,8). However,
84 despite their mechanism of action has remained largely elusive (9,10), recent
85 investigations have started to unveil the complex molecular events associated
86 with the therapeutic effects of polyphenols on atherosclerosis and
87 inflammatory diseases (11,12,13,14). Our previous work demonstrated that
88 polyphenols from propolis have beneficial actions for preventing or reducing
89 atherosclerotic lesions in LDLR-deficient mice through the modulation of
90 angiogenic factors (15). In this regard, the beneficial effects of polyphenols on
91 diseases have been partially attributed to their capacity to retard angiogenesis
92 in pathological conditions (16).

93 The formation of new blood vessels from preexisting vasculature,
94 denominated angiogenesis is crucial for the development. However, an
95 imbalance in this process contributes to numerous disorders, especially
96 malignant and inflammatory conditions (17). Experiments on cells bearing
97 inactivating mutations in the hypoxia-inducible factor (HIF) pathway
98 underscored the importance of HIF (particularly HIF-1 α) in regulating genes

99 involved in angiogenesis (18).

100 The entire HIF family of oxygen-sensitive transcription factors plays a key role
 101 in angiogenesis (17). HIF-1 α is the most commonly studied member; it forms
 102 a transcriptionally active heterodimeric complex with HIF-1 β (19). The
 103 expression of HIF-1 α is maintained at very low levels under normoxic
 104 conditions, as it is effectively ubiquitinated and targeted for rapid proteasomal
 105 degradation by the von-Hippel–Landau (pVHL) protein, a component of an E3
 106 ubiquitin ligase complex (19). During normoxia, the recognition of HIF-1 α by
 107 the pVHL complex is mediated by the oxygen-dependent hydroxylation of
 108 specific proline residues (HIF-1 α Pro⁴⁰² and Pro⁵⁶⁴). When oxygen levels are
 109 reduced, prolyl hydroxylase activity is inhibited; HIF-1 α is no longer modified
 110 and is thus stabilized. HIF-1 α then translocates to the nucleus where, as part
 111 of a dimeric complex with the constitutively expressed HIF-1 β protein, it
 112 modulates the expression of specific target genes involved in the regulation of
 113 angiogenesis (18).

114 Despite extensive research on the biological effects of propolis, there are no
 115 data concerning the effects of red propolis polyphenols (RPPs) on the
 116 transcription factor HIF-1 α , the major regulator of angiogenic processes under
 117 hypoxic conditions. In this study, we investigated the impact of RPPs,
 118 enriched in 1,2,3-trimethoxy-5-(2-propenyl)-benzene, methoxyeugenol,
 119 homopterocarpin, medicarpin, 2,4,6-trimethylphenol, 4',7-dimethoxy-2'-
 120 isoflavonol, 7,4'-dihydroxyisoflavone, 2*H*-1-benzopyran-7-ol (20), on
 121 angiogenesis and elucidated the mechanism of RPPs-induced HIF-1 α stability
 122 regulation.

123 MATERIALS AND METHODS

124

125 **Materials.** Medium, supplements, fetal bovine serum (FBS) and fetal calf
126 serum (FCS) were purchased from PAA (Linz, Austria). Type I rat tail collagen
127 was obtained from BD Biosciences (Heidelberg, Germany). Triton X-100, 4',6-
128 diamidino-2-phenylindol (DAPI), MG132 (Z-Leu-Leu-Leu-CHO), cycloheximide
129 (CHX), dimethyloxallyl-glycine (DMOG) and Glasgow minimal essential
130 medium (GMEM) were purchased from Sigma-Aldrich (Taufkirchen,
131 Germany). Horseradish peroxidase-labeled anti-mouse, nitrocellulose
132 membrane and ECL detection reagents were from GE Biosciences (Freiburg,
133 Germany). Antibodies were supplied by Millipore (anti-CD31), BD Biosciences
134 (anti-HIF-1 α and anti-pVHL) and Sigma-Aldrich (anti- α -tubulin). All chemicals
135 were commercially available and of highest purity.

136

137 **Polyphenolic extract from red propolis.** Crude red propolis was obtained
138 from the Laboratory of Pharmaceutical Science at the Federal University of
139 Alfenas, Minas Gerais, Brazil. Propolis (100 g) was mixed with 450 ml of 80%
140 ethanol (v/v), incubated in a water bath at 70°C for 30 min and filtered to
141 obtain the ethanolic extract of propolis (EEP). The EEP was passed through
142 an OASIS column (Waters, Milford, MA, USA; Wat106202), and the
143 polyphenols were eluted with methanol to obtain the concentrated polyphenol
144 solution (CPS). The CPS was dried and dissolved in 70% ethanol to yield the
145 RPPs solution. One gram of crude propolis provided 30.6 $\pm$ 2.9 mg of
146 polyphenol extract, which was expressed as gallic acid.

147 **Cell culture.** The human endothelial-like immortalized endothelial cell (EC)
148 line EA.hy926 was maintained in DMEM with 4.5 g/l glucose supplemented
149 with 2% HAT (100 μ l hypoxanthine, 0.4 μ l aminopterin, and 16 μ l thymidine), 2
150 mM glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, 1 mM sodium
151 pyruvate and 10% of FBS. Renal cell carcinoma (RCC4) and RCC4 cells with
152 reintroduced pVHL (RCC4/pVHL) were cultured in the same medium without
153 the HAT supplement. The mouse embryonic stem cell (mES) line CGR was
154 cultured on 0.1% gelatin-coated cell culture flasks in GMEM medium to keep
155 the cells in the stage for proliferation (21). The medium was supplemented
156 with 9% heat-inactivated (56°C, 30 min) FBS, 2 mM L-glutamine (Biochrom,
157 Berlin, Germany), 45 μ M β -mercaptoethanol (Sigma-Aldrich) and 103 U/ml
158 leukemia inhibitory factor (LIF; Chemicon, Hampshire, UK). All cell lines were
159 cultured in a humidified atmosphere with 5% CO₂ at 37°C. For hypoxic
160 exposure, cells were incubated with 1.0% O₂ in a hypoxia workstation
161 (Ruskin Technology, Leeds, United Kingdom).

162

163 **Wound healing assay (cell migration).** Monolayers of EC (90% of
164 confluence) were starved for 16 h in serum-free medium and wounded by
165 scraping away a swath of cells with the tip of a 200- μ l pipette (22). After
166 scraping, the cells were treated with a single concentration of 0.1% EtOH or
167 RPPs (10 μ g/ml). After EC wounding, images were recorded immediately
168 (time zero) and after 16 h. The movement of cells into the denuded area was
169 evaluated with an inverted phase-contrast microscope at 100x magnification
170 and photographed. All experiments were performed in triplicate, and each
171 experiment was repeated at least three times.

172 **Aortic ring vessel sprouting assay.** Aortas were harvested from 200-300 g
173 male Wistar rats (*Rattus norvegicus*; 6-8 wk old). The animals were
174 anesthetized intraperitoneally with a mixture of xylazine (1 mg/100 g
175 bodyweight) and ketamine (10 mg/100 g bodyweight) before killed by cervical
176 dislocation. Connective tissue was removed, and aortas were cut into 1 mm-
177 1.5 mm rings. Rat aortic rings were prepared and embedded into a type I
178 collagen gel as described previously (23). These *ex vivo* cultures were treated
179 with a single concentration of 0.1% EtOH or RPPs (10 µg/ml). After 7 days of
180 culture, the aortic rings were photographed under a microscope (20x), and the
181 images were digitalized and analyzed. The study protocols were approved by
182 the Ethics Committee for Animal Studies of the Faculty of Pharmaceutical
183 Sciences, University of Sao Paulo (protocol number 170/2009), and followed
184 the rules of the Guide for the Care and the Use of Laboratory Animals
185 published by the US National Institutes of Health (NHI Publication N 85-23,
186 revised in 1996).

187

188 **Chorioallantoic membrane assay.** Fertilized eggs were incubated at 37°C in
189 a humidified incubator. On the third day of development a rectangular window
190 was cut in the eggshell. On day 8, a filter ring was placed on the surface of the
191 CAM. The treatments were dissolved in Ringer solution, and 10 µl of each
192 (0.1% EtOH or 10 µg/ml RPPs) was added in the filter over 3 consecutive
193 days (24). At the end of experimental period the filters were fixed in 10%
194 formalin. The area was photographed under a microscope (10x). At least 10
195 eggs were used for each group.

196

197 ***Differentiation of embryonic stem cells.*** Embryonic bodies (EBs) were
 198 generated using 1000 mES cells in 35 µl of medium. The hanging drops were
 199 seeded on 10 cm dishes for 2 d and cultivated without LIF. The EBs were
 200 plated (15 per dish) on Lumox dishes (Greiner Bio-one, Frickenhausen,
 201 Germany) for 2 d prior to the commencement of treatment incubations. RPPs
 202 were diluted in medium to a concentration of 10 µg/ml and added to the EBs
 203 for 5 consecutive days. For control experiments, EBs with regular culture
 204 medium and medium containing 0.1% EtOH were analyzed. Following
 205 incubations, the EBs were fixed with methanol at -20°C for 1 d. The anti-CD31
 206 antibody was incubated with the specimens overnight at 4°C. The EBs were
 207 then incubated with anti-rat-cy3 antibody for 1 h at RT. DAPI was added for
 208 the last 20 min to stain the nuclei (21). The specimens were mounted on glass
 209 slides and the fluorescence was analyzed with the Laser Scanning System
 210 LSM 510 META (Configuration 30 Meta Zen 2007) from Zeiss (Zeiss,
 211 Göttingen, Germany). The CD31-positive areas were quantified with the Zeiss
 212 ZEN software.

213

214 ***Quantitative Real-Time RT-PCR.*** One day before experiments, 5×10^5 cells
 215 were seeded. On the following day, the medium was changed, and the cells
 216 were treated as indicated. The total RNA was isolated using the peqGOLD
 217 RNAPure kit (PepqLab, Erlangen, Germany). The reverse transcription was
 218 completed with a Clontech Advantage RT-for-PCR kit using hexamer random
 219 primers. The following primer pairs were selected for quantitative real-time
 220 PCR: human VEGF forward: 5'- TACCTCCACCATGCCAGGTG-3' and
 221 reverse: 5'- AAGATGTCCACCAGGGTCTC-3'; human HIF-1α forward: 5'-

222 CTCAAAGTCGGACAGCCTCA-3' and reverse: 5'
 223 CCCTGCAGTAGGTTTCTGCT-3'; human GLUT-1 forward: 5'-
 224 GAGGAGCTCTTCCACCCTCT-3' and reverse: 5'
 225 TCCTCCTGGACTTCACTGCT-3'; human ADM forward: 5'-
 226 CGCAGTTCCGAAAGAAGTGG-3' and reverse: 5'-
 227 CCAGTTGTGTTCTGCTCGTCC-3'; and human 18S forward: 5'-
 228 GTAACCCGTTGAACCCCA-3' and reverse: 5'-
 229 CCATCCAATCGGTAGTAGCG-3'. The quantitative real-time PCR was
 230 performed in a Bio-Rad CFX96™ Real-Time system (Munich, Germany) using
 231 Absolute Blue QPCR SYBR Green Mix (Thermo Fisher Scientific, Bonn,
 232 Germany). The expression of each target gene was normalized to the relative
 233 expression of 18S rRNA as an internal efficiency control. The values are
 234 expressed as fold increases relative to the untreated control.
 235
 236 **Western blotting.** For Western blot analysis, 1×10^6 cells were seeded in 6-
 237 cm dishes 1 d before experiments. After treatment, the cells were scraped off,
 238 lysed in 50 μ l buffer (50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.5%
 239 Nonidet-40, protease inhibitor cocktail, pH 7.5). Protein was detected in the
 240 supernatant using a protein assay kit (Bio-Rad, Munich, Germany). Protein
 241 (100 μ g) was added to the same volume of 4x SDS-PAGE sample buffer (125
 242 mM Tris/HCl, 2% SDS, 10% glycerin, 1 mM DTT, 0.002% bromophenol blue,
 243 pH 6.9) and boiled at 95°C for 5 min. Proteins were resolved on 10% SDS-
 244 polyacrylamide gels and blotted onto nitrocellulose membranes. Nonspecific
 245 binding was blocked with 5% (w/v) defatted milk powder in TTBS (50 mM
 246 Tris/HCl, 140 mM NaCl, 0.05% Tween-20, pH 7.2) for 1 h. The HIF-1 α , pVHL

247 and α -tubulin antibodies (1:1000, 1:500 and 1:3000, respectively, in 1%
248 milk/TTBS) were added and incubated overnight at 4°C. The blots were then
249 incubated with goat anti-mouse antibodies conjugated with HRP (1:3000 in
250 1% milk/TTBS) for 1 h. The blots were evaluated by ECL detection.

251

252 **VEGF release measurement by ELISA.** ECs (5×10^5 cells) were incubated
253 for the indicated times with or without RPPs under normoxic or hypoxic
254 conditions or following the addition of cell permeable prolyl-4-hydroxylase
255 inhibitor, DMOG (1mM). Cell-free supernatants were harvested and
256 centrifuged at 15000xg for 5 min at 4°C. VEGF levels in the conditioned
257 medium were measured by ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN).

258

259 **Statistical analysis.** The data were analyzed using SPSS 12.0 for MAC
260 (SPSS, Chicago, IL, USA). Each experiment was performed at least three
261 times. Representative images are shown. The data are presented as mean
262 values $\pm$ S.D. Statistical analysis was performed using student's t-test. $P <$
263 0.05 was considered statistically significant.

264

265

266 **RESULTS**

267

268 **RPPs attenuate angiogenesis in vitro, ex vivo and in vivo models.** Taking
269 previous reports into consideration, our aim was to understand the molecular
270 pathways involved in the anti-angiogenic effects of RPPs. As the use of
271 natural product-derived extracts is often impaired by toxic side effects, we

initially determined the cellular toxicity. The incubation of ECs with increasing doses of RPPs extract revealed no toxicity up to 10 µg/ml (**Supplemental Fig. 1**). Therefore, the experiments were performed with the maximum tolerable RPPs concentration of 10 µg/ml and were compared to the vehicle control (0.1% EtOH). To assess the impact of RPPs on angiogenesis, we first employed a cell migration assay. RPPs significantly prevented the migration of ECs by 68% compared to the control (**Fig. 1A**). To determine whether RPPs also counteracts the formation of new vessels, we used the aortic ring assay to follow microvessel sprouting. In comparison to the controls, sprouting was diminished by 69% in the presence of RPPs (**Fig. 1B**). Additionally, we evaluated the influence of RPPs on neovascularization *in vivo* by employing the CAM assay. RPPs significantly inhibited naturally occurring neovascularization from existing vessels by 51% compared to the vehicle-treated controls (**Fig. 1C**).

Because the differentiation of precursor cells into ECs plays a crucial role in the development of new blood vessels, we examined the impact of RPPs on the differentiation of embryonic bodies (EBs) into CD31-positive cells. RPPs significantly reduced the autodifferentiation of stem cells into CD31-positive cells by 65% as compared to the control (**Fig. 1D**). These data suggest that RPPs strongly antagonizes angiogenesis by repressing migration, sprouting, neovascularization and endothelial cell differentiation.

RPPs inhibit VEGF expression in endothelial cells. Angiogenesis is a highly regulated process and is to some extent under the control of VEGF (1). Because RPPs potentially interferes with angiogenesis, we hypothesized that

297 either VEGF expression or VEGF-signaling might be affected. Therefore, we
 298 analyzed VEGF expression in ECs. As expected, hypoxia (1% oxygen)
 299 strongly induced VEGF mRNA expression (**Fig. 2A**). The response was
 300 transient, reaching the maximum at 16 h and declining towards 24 h of
 301 incubation. Thus, RPPs efficiently inhibited hypoxia-induced VEGF mRNA
 302 expression. Hypoxia-induced VEGF release was also evident at the protein
 303 level, with a time-dependent VEGF increase from 8 to 24 h (**Fig. 2B**). VEGF
 304 protein expression was completely absent in the presence of RPPs. Similar to
 305 hypoxia, DMOG (1 mM) induced VEGF mRNA as well as protein expression,
 306 which was significantly inhibited by RPPs (**Fig. 2C and 2D**).

307

308 ***RPPs inhibit HIF-1 α protein and target gene expression.*** Considering the
 309 direct link between HIF-1 and hypoxia- as well as DMOG-induced VEGF
 310 expression, we determined the impact of RPPs on HIF-1 α expression and the
 311 activation of HIF-1. Hypoxia-induced HIF-1 α protein accumulation was dose-
 312 dependently attenuated by RPPs (**Fig. 3A**). Complete inhibition of the HIF-1 α
 313 response was achieved at a concentration of 10 μ g/ml RPPs with substantial
 314 inhibition evident at much lower concentrations (0.6 to 1.2 μ g/ml RPPs).
 315 Additionally, RPPs time-dependently blocked HIF-1 α accumulation.
 316 Substantial inhibition started after exposure for 1 h and became complete
 317 when present for 4 h (**Fig. 3B**). To prove the functional consequences of this
 318 inhibition, we examined the expression of the HIF-1 target genes
 319 adrenomedulin (ADM) and glucose transporter-1 (GLUT-1). The hypoxic
 320 induction of both targets was substantially repressed in the presence of RPPs
 321 (**Fig. 3C**). Interestingly, HIF-1 α mRNA expression remained unaltered in the

322 presence of RPPs both under normoxia and hypoxia after 16 h of incubation
 323 with RPPs (**Fig. 3D**). Apparently, RPPs attenuate HIF-1 α expression at a
 324 post-transcriptional level, thus affecting HIF-1-dependent cellular adaptive
 325 responses.

326

327 ***RPPs decrease HIF-1 α protein stability.*** Because we previously excluded
 328 the transcriptional effects of RPPs to account for altered HIF-1 α expression,
 329 we next examined post-transcriptional regulatory mechanisms. First, we
 330 analyzed the impact of RPPs on the half-life of the HIF-1 α protein. We
 331 exposed the ECs cells to 1% oxygen for 4 h before blocking translation by the
 332 addition of 10 μ M cycloheximide (CHX). The HIF-1 α protein expression was
 333 subsequently followed over the next 60 min. The protein was markedly more
 334 stable in the absence of RPPs ($t_{1/2}$ = 58.5 min) than in comparison to the
 335 RPPs-treated conditions ($t_{1/2}$ = 38.5 min; **Fig. 4A and 4 B**). This was indicated
 336 the post-translational regulation of HIF-1 α by RPPs. Because the HIF-1 α
 337 protein is degraded via the proteasome, we determined the effects of RPPs
 338 on HIF-1 α protein accumulation under normoxic conditions when proteasomal
 339 degradation is blocked. RPPs did not prevent MG132-induced accumulation
 340 of HIF-1 α after 3 to 4 h of incubation (**Fig. 4C**). Further evidence for a role of
 341 RPPs in HIF-1 α degradation came from experiments in renal carcinoma cells
 342 (RCC4) that were deficient in the E3 ubiquitin ligase pVHL and express HIF-1
 343 constitutively. This protein is required for efficient degradation of HIF-1 α via
 344 the proteasome. RPPs failed to alter constitutive expression of HIF-1 α protein,
 345 when incubated up to 4 h in RCC4 cells (**Fig. 4D**). When pVHL was
 346 reconstituted to RCC4 cells, hypoxia-induced HIF-1 α accumulation became

347 resensitized to RPPs. Consequently, the HIF-1 α expression disappeared over
348 4 h incubations (**Fig. 4E**). Together, these data suggest that RPPs decreases
349 HIF-1 α protein stability by fostering its pVHL-dependent proteasomal
350 degradation.

351

352 ***RPPs induce pVHL expression.*** To explore the potential mechanisms that
353 could explain RPPs-induced proteasomal degradation of HIF-1 α , we
354 considered the ubiquitin ligase complex of utmost importance. Under hypoxia
355 we noticed a decrease in the expression of pVHL that was reversed in the
356 presence of RPPs (**Fig. 5**). In line with a previous report (24) describing the
357 repressive function of Cdc42 on pVHL expression, we determined Cdc42
358 protein expression. Interestingly, under hypoxia RPPs lowered the amount of
359 Cdc42 protein in ECs (**Fig. 5**). This indicates that Cdc42 expression is
360 suppressed by RPPs under hypoxic conditions, which allows for an increase
361 pVHL expression and the concomitant decrease in HIF-1 α .

362

363 **DISCUSSION**

364

365 The transcription factor HIF-1 plays a key role in the pathology of various
366 diseases associated with hypoxic conditions and angiogenesis (25,26,27).
367 Numerous attempts have been made to identify compounds that inhibit the
368 accumulation of HIF-1 α , the regulated sub-unit of HIF-1 (28,29). The present
369 findings demonstrate for the first time that Cdc42 expression is suppressed by
370 RPPs under hypoxic conditions, which facilitates an increased pVHL
371 expression. Consequently, RPPs attenuate HIF-1 α protein accumulation

under hypoxic conditions leading to the suppression of relevant target genes (VEGF, ADM and GLUT-1). Concomitantly, the loss of HIF-1 α signal induced by RPPs result in reduced angiogenic responses in ECs.

Angiogenesis is a tightly regulated multistep process. In this study, we show that RPPs reduced *in vitro* ECs migration, *ex vivo* organization into capillary structures, and *in vivo* formation of new blood vessels. Additionally, RPPs reduced the differentiation of stem cells into CD31-positive cells.

Epidemiological studies have suggested that dietary intake of polyphenols reduces the incidence of various diseases associated with increased expression of VEGF and angiogenesis, including atherosclerosis and cancer (30,31,32,33). Therefore, VEGF inhibition is an important therapeutic target for such diseases (34,35,36). We show that RPPs decrease VEGF expression at the transcriptional level and reduce VEGF protein secretion by ECs both under normoxic and hypoxic conditions. Our data corroborated with a previous study (37) that demonstrated the inhibition of angiogenic processes by decreasing VEGF expression through transcriptional and translational mechanisms in cells treated with polyphenols. Similarly, an investigation (38) attributed the anti-tumor properties of the dietary polyphenol apigenin to the inhibition of HIF-1 α and VEGF expression mediated via an PI3K/AKT/p70S6K1- and/or HDM2/p53-dependent mechanism. Furthermore, polyphenols from grape seed extract (GSE) were shown to suppress angiogenesis by inhibiting VEGF production in prostate cancer through the VEGF-receptor signaling pathway (39,40). GSE inhibited VEGF expression in human breast cancer cells and human glioma cells by inhibiting HIF-1 α protein expression, but it had no apparent inhibitory effects on HIF-1 α mRNA

397 expression (41).

398 Like many other factors, including GLUT-1 and ADM, VEGF is critical for
399 adaptation to hypoxic environments and is primarily regulated by HIF-1 under
400 oxygen-deprived conditions (42). Here we provide evidence that RPPs
401 promote HIF-1 α destabilization through the increased pVHL-dependent
402 proteasomal degradation. Specifically, we found that RPPs increase pVHL
403 protein expression, which results in HIF-1 α destabilization. Interestingly, high
404 pVHL levels might limit HIF-1 α protein stability even under hypoxic conditions.
405 While a loss of HIF-1 α stability under hypoxic conditions even in the presence
406 of high pVHL levels appears counterintuitive, a previous report supports the
407 possibility that the excess of pVHL protein results in downregulation of HIF-1 α
408 protein even under hypoxic conditions (43,44).

409 We further showed that increased pVHL protein expression under hypoxia in
410 response to RPPs correlate with a decreased expression of the Rho GTPase
411 Cdc42. This is in accordance with a previous report (25) in which the
412 activation of Cdc42 was proposed to contribute to the hypoxia-induced
413 production of angiogenesis promoting factors. It was specifically demonstrated
414 that activation of Cdc42 by hypoxic treatments decreased pVHL expression.
415 Our data indicate that RPPs downregulate the total Cdc42 expression under
416 hypoxic conditions. In line with the aforementioned report, we showed that
417 pVHL is rescued from hypoxia-induced downregulation by RPPs. The
418 observation that pVHL levels even increased beyond normoxic expression
419 levels might be of importance as elevated pVHL levels have been reported to
420 facilitate HIF-1 α degradation under hypoxic conditions even in the absence of
421 efficient hydroxylation of HIF-1 α (43,44,45,46). Interestingly, genistein, the

422 main isoflavonoid from soybeans suppresses HIF-1 α expression in response
 423 to hypoxia, which was associated with the inhibition of Cdc42 (25).

424 In summary, our findings provide evidence that RPPs have antiangiogenic
 425 effects *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* as a result of an effective inhibition of VEGF
 426 expression. Mechanistically, the VEGF inhibitory effect of RPPs were
 427 attributed to the destabilization of HIF-1 α under hypoxic conditions. This
 428 destabilization is achieved via an elevated expression of the pVHL E3
 429 ubiquitin ligase as a consequence of attenuated Cdc42 expression. Taken
 430 together, RPPs display potent antiangiogenic properties by targeting key
 431 processes that are required for new blood vessel development. This supports
 432 the role of RPPs as potential natural chemopreventive agents to attenuate
 433 angiogenic processes.

434

435 **ACKNOWLEDGEMENTS**

436 We would like to thank Dr. C.J. Edgell (University of North Carolina, USA) for
 437 endothelial-like immortalized endothelial cell (EC) line EA.hy926, Prof.
 438 Wartenberg (Friedrich Schiller University, Germany) for mouse embryonic
 439 stem cells, Tanja Keppler and Elaine Augusto for their excellent technical
 440 assistance. J.B.D., T.S., N.D. designed research; J.B.D., T.G, H.M., M.I.
 441 T.P.O. and M.R. conducted research; J.B.D, T.S., N.D., B.B. and D.S.P.A
 442 analyzed data; J.B.D., T.S., D.N., M.R., B.B and D.S.P.A. wrote the paper;
 443 and J.B.D. had primary responsibility for final content. All authors read and
 444 approved the final manuscript.

445

446

447 **Literature Cited**

- 448 1. Izuta H, Shimazawa M, Tsuruma K, Araki Y, Mishima S, Hara H. Bee
 449 products prevent VEGF-induced angiogenesis in human umbilical vein
 450 endothelial cells. *BMC Complement Altern Med.* 2009,9:45.
- 451 2. Cardoso RL, Maboni F, Machado G, Alves SH, de Vargas AC.
 452 Antimicrobial activity of propolis extract against *Staphylococcus*
 453 *coagulase positive* and *Malassezia pachydermatis* of canine otitis. *Vet*
 454 *Microbiol.* 2010,142:432-4.
- 455 3. dos Santos DA, Fukui Mde J, Dhammika Nanayakkara NP, Khan SI,
 456 Sousa JP, Bastos JK, Andrade SF, da Silva Filho AA, Quintão NL. Anti-
 457 inflammatory and antinociceptive effects of *Baccharis dracunculifolia*
 458 DC (Asteraceae) in different experimental models. *J Ethnopharmacol.*
 459 2010,127:543-50.
- 460 4. Munstedt K, Kalder M. Contact allergy to propolis in beekeepers.
 461 *Allergol Immunopathol (Madr).* 2009,37:298-301.
- 462 5. Pagliarone AC, Missima F, Orsatti CL, Bachiega TF, Sforcin JM.
 463 Propolis effect on Th1/Th2 cytokines production by acutely stressed
 464 mice. *J Ethnopharmacol.* 2009,125:230-3.
- 465 6. Badimon L, Vilahur G, Padro T. Nutraceuticals and atherosclerosis:
 466 human trials. *Cardiovasc Ther.* 2010,28:202-15.
- 467 7. Chong MF, Macdonald R, Lovegrove JA. Fruit polyphenols and CVD
 468 risk: a review of human intervention studies. *Br J Nutr.* 2010,104 Suppl
 469 3:S28-S39.
- 470 8. Heiss C, Keen CL, Kelm M. Flavanols and cardiovascular disease
 471 prevention. *Eur Heart J.* 2010,31:2583-92.

- 472 9. Dou QP. Molecular mechanisms of green tea polyphenols. Nutr
473 Cancer. 2009,61:827-35.
- 474 10. Qin B, Polansky MM, Harry D, Anderson RA. Green tea polyphenols
475 improve cardiac muscle mRNA and protein levels of signal pathways
476 related to insulin and lipid metabolism and inflammation in insulin-
477 resistant rats. Mol Nutr Food Res. 2010,54 Suppl 1:S14-S23.
- 478 11. Giovannini C, Scazzocchio B, Vari R, Santangelo C, D'Archivio M,
479 Masella R. Apoptosis in cancer and atherosclerosis: polyphenol
480 activities. Ann Ist Super Sanita. 2007,43:406-16.
- 481 12. Vivancos M, Moreno JJ. Effect of resveratrol, tyrosol and beta-sitosterol
482 on oxidised low-density lipoprotein-stimulated oxidative stress,
483 arachidonic acid release and prostaglandin E2 synthesis by RAW
484 264.7 macrophages. Br J Nutr. 2008,99:1199-207.
- 485 13. Lo HM, Hung CF, Huang YY, Wu WB. Tea polyphenols inhibit rat
486 vascular smooth muscle cell adhesion and migration on collagen and
487 laminin via interference with cell-ECM interaction. J Biomed Sci.
488 2007,14:637-45.
- 489 14. Ariga T. The antioxidative function, preventive action on disease and
490 utilization of proanthocyanidins. Biofactors. 2004,21:197-201.
- 491 15. Daleprane JB, Freitas VS, Pacheco A, Rudnicki M, Faine LA, Dörr
492 FA, Ikegaki M, Salazar LA, Ong TP. Anti-atherogenic and anti-
493 angiogenic activities of polyphenols from propolis. J Nutr Biochem.
494 2011, doi:10.1016/j.jnutbio.2011.02.012.
- 495 16. Harper CE, Cook LM, Patel BB, Wang J, Eltoum IA, Arabshahi A, et al.
496 Genistein and resveratrol, alone and in combination, suppress prostate

- 497 cancer in SV-40 tag rats. Prostate. 2009,69:1668-82.
- 498 17. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. Nature 1997,386:671-4.
- 499 18. Nangaku M, Inagi R, Miyata T, Fujita T. Hypoxia and hypoxia-inducible
500 factor in renal disease. Nephron Exp Nephrol. 2008,110:e1-e7.
- 501 19. Wotzlaw C, Otto T, Berchner-Pfannschmidt U, Metzen E, Acker H,
502 Fandrey J. Optical analysis of the HIF-1 complex in living cells by
503 FRET and FRAP. FASEB J. 2007,21:700-7.
- 504 20. Alencar SM, Oldoni TL, Castro ML, Cabral IS, Costa-Neto CM, Cury
505 JA, Rosalen PL, Ikegaki M. Chemical composition and biological
506 activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. J
507 Ethnopharmacol. 2007,113:278-83.
- 508 21. Werno C, Menrad H, Weigert A, Dehne N, Goerdts S, Schledzewski K,
509 Kzhyshkowska J, Brüne B. Knockout of HIF-1alpha in tumor-associated
510 macrophages enhances M2 polarization and attenuates their pro-
511 angiogenic responses. Carcinogenesis. 2010,31:1863-72.
- 512 22. Slevin M, Kumar P, Gaffney J, Kumar S, Krupinski J. Can angiogenesis
513 be exploited to improve stroke outcome? Mechanisms and therapeutic
514 potential. Clin Sci (Lond). 2006,111:171-83.
- 515 23. Nicosia RF, Lin YJ, Hazelton D, Qian X. Endogenous regulation of
516 angiogenesis in the rat aorta model. Role of vascular endothelial
517 growth factor. Am J Pathol. 1997,151:1379-86.
- 518 24. Larger E, Marre M, Corvol P, Gasc JM. Hyperglycemia-induced defects
519 in angiogenesis in the chicken chorioallantoic membrane model.
520 Diabetes. 2004,53:752-61.
- 521 25. Xue Y, Bi F, Zhang X, Zhang S, Pan Y, Liu N, Shi Y, Yao X, Zheng Y,

- 522 Fan D. Role of Rac1 and Cdc42 in hypoxia induced p53 and von
523 Hippel-Lindau suppression and HIF1alpha activation. *Int J Cancer*.
524 2006,118:2965-72.
- 525 26. Milkiewicz M, Ispanovic E, Doyle JL, Haas TL. Regulators of
526 angiogenesis and strategies for their therapeutic manipulation. *Int J*
527 *Biochem Cell Biol*. 2006,38:333-57.
- 528 27. Zhang J, Liu A, Hou R, Zhang J, Jia X, Jiang W, Chen J. Salidroside
529 protects cardiomyocyte against hypoxia-induced death: a HIF-1alpha-
530 activated and VEGF-mediated pathway. *Eur J Pharmacol*. 2009,607:6-
531 14.
- 532 28. Jung HJ, Shim JS, Lee J, Song YM, Park KC, Choi SH, Kim ND, Yoon
533 JH, Mungai PT, Schumacker PT, Kwon HJ. Terpestacin inhibits tumor
534 angiogenesis by targeting UQCRB of mitochondrial complex III and
535 suppressing hypoxia-induced reactive oxygen species production and
536 cellular oxygen sensing. *J Biol Chem*. 2010,285:11584-95.
- 537 29. Hirota SA, Beck PL, MacDonald JA. Targeting hypoxia-inducible factor-
538 1 (HIF-1) signaling in therapeutics: implications for the treatment of
539 inflammatory bowel disease. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov*.
540 2009,3:1-16.
- 541 30. Oak MH, El BJ, Schini-Kerth VB. Antiangiogenic properties of natural
542 polyphenols from red wine and green tea. *J Nutr Biochem*. 2005,16:1-
543 8.
- 544 31. Klement H, St Croix B, Milsom C, May L, Guo Q, Yu JL, Klement P,
545 Rak J. Atherosclerosis and vascular aging as modifiers of tumor
546 progression, angiogenesis, and responsiveness to therapy. *Am J*

- 547 Pathol. 2007,171:1342-51.
- 548 32. Kavantzias N, Chatziioannou A, Yanni AE, Tsakayannis D, Balafoutas
549 D, Agrogiannis G, Perrea D. Effect of green tea on angiogenesis and
550 severity of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbit. *Vascul Pharmacol*.
551 2006,44:461-3.
- 552 33. Tham DM, Gardner CD, Haskell WL. Clinical review 97: Potential
553 health benefits of dietary phytoestrogens: a review of the clinical,
554 epidemiological, and mechanistic evidence. *J Clin Endocrinol Metab*.
555 1998,83:2223-35.
- 556 34. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial
557 growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J*. 1999,13:9-22.
- 558 35. Holash J, Davis S, Papadopoulos N, Croll SD, Ho L, Russell M, Boland
559 P, Leidich R, Hylton D, Burova E, Ioffe E, Huang T, Radziejewski C,
560 Bailey K, Fandl JP, Daly T, Wiegand SJ, Yancopoulos GD, Rudge JS.
561 VEGF-Trap: a VEGF blocker with potent antitumor effects. *Proc Natl*
562 *Acad Sci USA*. 2002,99:11393-8.
- 563 36. Elias JA, Kang MJ, Crothers K, Homer R, Lee CG. State of the art.
564 Mechanistic heterogeneity in chronic obstructive pulmonary disease:
565 insights from transgenic mice. *Proc Am Thorac Soc*. 2006,3:494-8.
- 566 37. Sagar SM, Yance D, Wong RK. Natural health products that inhibit
567 angiogenesis: a potential source for investigational new agents to treat
568 cancer-Part 1. *Curr Oncol*. 2006,13:14-26.
- 569 38. Fang J, Xia C, Cao Z, Zheng JZ, Reed E, Jiang BH. Apigenin inhibits
570 VEGF and HIF-1 expression via PI3K/AKT/p70S6K1 and HDM2/p53
571 pathways. *FASEB J*. 2005,19:342-53.

- 572 39. Singh RP, Tyagi AK, Dhanalakshmi S, Agarwal R, Agarwal C. Grape
573 seed extract inhibits advanced human prostate tumor growth and
574 angiogenesis and upregulates insulin-like growth factor binding protein-
575 3. *Int J Cancer*. 2004;108:733-40.
- 576 40. Wen W, Lu J, Zhang K, Chen S. Grape seed extract inhibits
577 angiogenesis via suppression of the vascular endothelial growth factor
578 receptor signaling pathway. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2008;1:554-61.
- 579 41. Lu J, Zhang K, Chen S, Wen W. Grape seed extract inhibits VEGF
580 expression via reducing HIF-1alpha protein expression.
581 *Carcinogenesis*. 2009;30:636-44.
- 582 42. Hu CJ, Wang LY, Chodosh LA, Keith B, Simon MC. Differential roles of
583 hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and HIF-2alpha in hypoxic
584 gene regulation. *Mol Cell Biol*. 2003;23:9361-74.
- 585 43. Sun X, Liu M, Wei Y, Liu F, Zhi X, Xu R, Krissansen GW.
586 Overexpression of von Hippel-Lindau tumor suppressor protein and
587 antisense HIF-1alpha eradicates gliomas. *Cancer Gene Ther*.
588 2006;13:428-35.
- 589 44. Kong X, Lin Z, Liang D, Fath D, Sang N, Caro J. Histone deacetylase
590 inhibitors induce VHL and ubiquitin-independent proteasomal
591 degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Mol Cell Biol*.
592 2006;26(6):2019-28.
- 593 45. Chi NC, Karliner JS. Molecular determinants of responses to
594 myocardial ischemia/reperfusion injury: focus on hypoxia-inducible and
595 heat shock factors. *Cardiovasc Res*. 2004;61(3):437-47.
- 596 46. Tan M, Gu Q, He H, Pamarthy D, Semenza GL, Sun Y.

597 SAG/ROC2/RBX2 is a HIF-1 target gene that promotes HIF-1 alpha
598 ubiquitination and degradation. Oncogene. 2008,27(10):1404-11.

599

600

601

602

603

604

605

606

607

608

609

610

611

612

613

614

615

616

617 **Figure Legends**

618

619 **FIGURE 1** RPPs inhibit the migration of ECs, the formation of ECs tubular
 620 structure, the formation of new blood vessels and the auto stem cell
 621 differentiation in CD31 positive cells. (A) Confluent ECs layers were wounded
 622 with a pipette and treated with 10 µg/ml RPPs. Wound closure of the scratch
 623 at 0 h was quantified after 16 h. (B) Rat aortic rings were embedded into a
 624 type I collagen gel and treated with a single dose of RPPs (10 µg/ml).
 625 Sprouting was evaluated after 7 days. (C) Fertilized eggs were incubated with
 626 filter rings and 10 µl of RPPs (10 µg/ml) were added to the filter for 3
 627 consecutive days. Subsequently, the neovascularization was determined. (D)
 628 Embryonic bodies (EBs) were treated with RPPs (10 µg/ml). The CD31-
 629 positive cells were monitored by immunofluorescence staining (red). Nuclei
 630 were stained with DAPI (blue). In all experiments 0.1% EtOH was used as a
 631 control. All data are represented as the mean $\pm$ SD ($n \geq 3$). * $P < 0.05$ *versus*
 632 control.

633

634 **FIGURE 2** VEGF expression is inhibited by RPPs in human ECs. (A) The ECs
 635 were incubated with RPPs (10 µg/ml) under hypoxic conditions (1% O₂) for
 636 the indicated time. The mRNA was analyzed by RT-qPCR. (B) The cell-free
 637 supernatants were harvested and centrifuged for ELISA analysis of the VEGF
 638 protein. Both the VEGF mRNA (C) and the secreted VEGF protein (D) were
 639 analyzed in response to 1 mM DMOG. Data are represented as the mean $\pm$
 640 SD ($n \geq 3$). * $P < 0.05$ *versus* control.

641

642 **FIGURE 3** RPPs inhibit the HIF-1 α protein and the respective target gene
 643 expression in ECs. (A) ECs were incubated under normoxic or hypoxic (1%
 644 O₂) conditions in the presence or absence of RPPs (0.3 - 10 μ g/ml) for 4 h. (B)
 645 Alternatively, ECs were incubated under hypoxic conditions with RPPs (10
 646 μ g/ml) for 0 - 4 h. The cells were harvested and the whole-cell lysates were
 647 analyzed by Western blotting. The α -tubulin level was used as a loading
 648 control. The blots are representative of the independent experiments
 649 performed at least 3 times. ECs were incubated under normoxia or hypoxia for
 650 4 h. The mRNA expression was determined using RT-qPCR analysis and the
 651 individual mRNAs (C) ADM and GLUT-1, and (D) HIF-1 α were normalized to
 652 the 18S rRNA expression. Data are represented as the mean $\pm$ SD (n $\geq$ 3). *P
 653 < 0.05 *versus* control.

654

655 **FIGURE 4** RPPs affect HIF-1 α expression via a pVHL-dependent mechanism.
 656 (A) The ECs were pre-incubated under hypoxic conditions (1% O₂) for 4 h and
 657 then co-treated with cycloheximide (CHX, 10 μ M) in the presence or absence
 658 of RPPs (10 μ g/ml) for the indicated times. (B) The representative half-life
 659 measurements of HIF-1 α in the presence of RPPs are shown. The intensities
 660 of HIF-1 α protein expression were quantified using an image analysis system.
 661 The values are represented as the mean $\pm$ SD (n $\geq$ 3). *P < 0.05. (C) The ECs
 662 were incubated as indicated with the proteasome inhibitor MG-132 in the
 663 presence or absence of RPPs (10 μ g/ml). (D) RCC4 and (E) RCC4/pVHL
 664 cells were incubated in the presence of RPPs (10 μ g/ml) for the indicated
 665 times. For protein expression analysis, the cells were harvested and the
 666 whole-cell lysates were analyzed by Western blotting. The α -tubulin level was

667 used as a loading control. The blots are representative of independent
668 experiments performed at least 3 times.

669

670 **FIGURE 5** RPPs block HIF-1 α expression by up-regulating pVHL and down-
671 regulating Cdc42 expression under hypoxic conditions. The ECs were
672 incubated under normoxic (21% O₂) or hypoxic (1% O₂) conditions in the
673 presence or absence of RPPs (10 μ g/ml) for 4 h. The cells were analyzed by
674 Western blotting. The α -tubulin level was used as a loading control.

675

676

677

678

679

680

681

682

683

684

685

686

687

688

689

690

691

692

693

694

695

696

697

698

699

700

701

702

703

704

705

706

ONLINE SUPPORTING MATERIAL

Supplemental Figure 1. Viability of human endothelial cells (ECs) after incubation with RPPs. ECs were treated with fresh medium containing different concentrations of RPPs (0.1-100 µg/mL) during 24hs. Values are means $\pm$ SD, n = 24 per treatment. *P < 0.05, **P < 0.01 and ***P < 0.001 vs control.

Figure 1

Figure 2

Figure 3

Figure 4

Figure 5

ANEXO 6**Informações para os membros de Bancas Julgadoras
de Mestrado/Doutorado**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Secretaria de Pós-Graduação

**Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de
Mestrado/Doutorado**

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

2.2 Tempo máximo total de arguição: 3 horas para o mestrado e 5 horas para o doutorado.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.

4.1 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

4.2 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 26 de maio de 2010.

Profa. Dra. Bernadette D. G. M. Franco
Presidente da CPG/FCF/USP

ANEXO 7**Ficha do aluno – FCF-USP**

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9132 - 6329028/1 - Julio Beltrame Daleprane

Email: juliobd@usp.br
Data de Nascimento: 22/10/1980
Cédula de Identidade: RG - 1.351.984 - ES
Local de Nascimento: Estado do Espírito Santo
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Nutricionista - Universidade Federal Fluminense - Rio de Janeiro - Brasil - 2005
Mestrado: Mestre em Ciências Médicas (1) - Universidade Federal Fluminense - Rio de Janeiro - Brasil - 2007

Curso: Doutorado
Programa: Ciência dos Alimentos
Área: Nutrição Experimental
Data de Matrícula: 15/02/2008
Início da Contagem de Prazo: 15/02/2008
Data Limite: 15/02/2012
Orientador Acadêmico: Prof(a). Dr(a). Bernadette Dora Gombossy de Melo Franco - 15/02/2008 a 19/02/2008
E.Mail: bfranco@usp.br
Orientador: Prof(a). Dr(a). Dulcineia Saes Parra Abdalla - 20/02/2008 até o presente. E.Mail: dspa@usp.br
Coorientador: Prof(a). Dr(a). Thomas Prates Ong - 24/09/2008 até o presente. E.Mail: tong@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 15/02/2008
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 10/03/2010
Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:
Histórico de Ocorrências: Ingressou no Doutorado em 15/02/2008
Matrícula de Acompanhamento em 21/02/2011

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 21/02/2011

Impresso em: 02/06/11 21:41:05

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9132 - 6329028/1 - Julio Beltrame Daleprane

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
HNT5705-4/2	Consumo Alimentar em Populações (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo)	04/03/2008	29/04/2008	60	4	95	A	N	Concluída
FBA5712-5/1	Fisiologia da Nutrição I	02/04/2008	13/05/2008	90	6	75	A	N	Concluída
NHA5705-2/1	Fundamentos da Biologia Molecular Aplicados à Nutrição Humana (Curso Interunidades: Nutrição Humana Aplicada - Universidade de São Paulo)	27/05/2008	30/06/2008	60	4	100	A	N	Concluída
FBC5709-4/2	Biologia Molecular em Análises Clínicas	01/09/2008	05/10/2008	75	5	100	A	N	Concluída
FBA5728-2/8	Aprimoramento Didático	07/10/2008	03/11/2008	60	4	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	20	20	23
Atividades Programadas:			
Seminários:			
Estágios:			
Total:	20	20	23

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Observações:

1) Curso com validade nacional, de acordo com o disposto na Portaria nº 2878, de 26.08.2005.

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 21/02/2011

Impresso em: 02/06/11 21:41:05

ANEXO 5**Currículo Lattes**

Julio Beltrame Daleprane

Possui graduação em Nutrição pela Universidade Federal Fluminense (2005). Durante dois anos 2006-2008) fez parte do quadro de docentes do Departamento de Nutrição e Dietética da Faculdade de Nutrição-UFF como professor Auxiliar. Mestre pelo curso de Ciências Médicas da Faculdade de Medicina - UFF, cursa o Doutorado na área de Ciência dos Alimentos, no Laboratório de Bioquímica Clínica, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo-USP. Tem experiência na área de Nutrição, com ênfase em Nutrição Experimental, Bioquímica e Desenvolvimento Fisiológico, atuando principalmente nos seguintes temas: Nutrigenômica, Nutrição Experimental, Angiogênese, Compostos Bioativos em Alimentos e Bioquímica.

(Texto informado pelo autor)

Última atualização do currículo em 07/06/2011

Endereço para acessar este CV:

<http://lattes.cnpq.br/6027048461430935>

Certificado
pelo autor em
07/06/11

[Rede de Colaboração](#)

[Diretório de grupos de pesquisa](#)

[SciELO - artigos em texto completo](#)

Dados pessoais

Nome Julio Beltrame Daleprane

Nome em citações bibliográficas DALEPRANE, Julio Beltrame; Daleprane, Julio Beltrame

Sexo Masculino

Endereço profissional Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas.
Rua Professor Lineu Prestes 580, Bloco 17
Centro
05508-900 - Sao Paulo, SP - Brasil
Telefone: (11) 30913637 Ramal: 3637
URL da Homepage: <http://www.usp.br>

Formação acadêmica/Titulação

- 2008** Doutorado em andamento em Ciências dos Alimentos (Conceito CAPES 7).
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
com período sanduíche em Goethe Universität Frankfurt am Main (Orientador: Bernhard Bruene).
Título: Modulação da expressão de proteínas angiogênicas por Polifenóis da Própolis, *Orientador:* Dulcineia Saes Parra Abdalla.
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.
Palavras-chave: Neoangiogênese; Polifenóis; Nutrigenômica.
Grande área: Ciências da Saúde / *Área:* Nutrição.
Grande área: Ciências da Saúde / *Área:* Farmácia.
- 2005 - 2007** Mestrado em Ciências Médicas (Conceito CAPES 4).
Universidade Federal Fluminense, UFF, Brasil.
Título: Avaliação da qualidade nutricional de duas variedades de soja e a influência de seu consumo nos indicadores de doenças cardiovasculares de ratos senis, *Ano de Obtenção:* 2007.
Orientador: Gilson Teles Boaventura.
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.
Palavras-chave: soja; histologia; perfil lipídico; aorta.
Grande área: Ciências da Saúde / *Área:* Nutrição / *Subárea:* Bioquímica da Nutrição.
Setores de atividade: Nutrição e Alimentação.
- 2001 - 2005** Graduação em Nutrição.
Universidade Federal Fluminense, UFF, Brasil.
Título: Estudo comparativo dos indicadores biológicos entre duas gerações de ratos Wistar alimentados exclusivamente com a soja (Glycine Max L. Merrill) orgânica e geneticamente modificada.
Orientador: Gilson Teles Boaventura.
Bolsista do(a): Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro, FAPERJ, Brasil.

Formação complementar

- 2009 - 2009** Aplicações da PCR Quantitativa em Tempo Real. (Carga horária: 30h).
Applied Biosystems do Brasil Ltda.

- 2009 - 2009** Food Nanotechnology. (Carga horária: 2h).
Faculdade de Ciências Farmacêuticas.
- 2008 - 2009** Extensão universitária em Atualização à Distância: Ética em Pesquisa. (Carga horária: 100h).
Universidade de Brasília.
- 2006 - 2006** Detecção de OGM'S em alimentos. (Carga horária: 12h).
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - CTAA.

Atuação profissional

Universidade Gama Filho, UGF, Brasil.

Vínculo institucional

2011 - Atual Vínculo: Colaborador, Enquadramento Funcional: Professor Pós-graduação

Vínculo institucional

2011 - Atual Vínculo: Colaborador, Enquadramento Funcional: Professor Graduação, Carga horária: 4

Outras informações Professor da disciplina de Dietoterapia e Fisipatologia

Atividades

04/2011 - Atual Ensino, Nutrição, Nível: Graduação.

Disciplinas ministradas
Dietoterapia e Fisipatologia

03/2011 - Atual Ensino, Personal Diet e Atendimento Nutricional, Nível: Pós-Graduação.

Disciplinas ministradas
Aspectos Gerais da Abordagem Nutricional

Universidade do Estado do Rio de Janeiro, UERJ, Brasil.

Vínculo institucional

2011 - Atual Vínculo: Colaborador, Enquadramento Funcional: Professor Pós-graduação

Atividades

05/2011 - Atual Ensino, Curso de Especialização em Terapia Nutricional, Nível: Especialização.

Disciplinas ministradas
Nutrigenômica

Goethe Univeristät Frankfurt am Main, G.U.F.M, Alemanha.

Vínculo institucional

2010 - 2010 Vínculo: Estagio, Enquadramento Funcional: Doutorando, Carga horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva.

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Vínculo institucional

2008 - 2009 Vínculo: Colaborador, Enquadramento Funcional: Representante Discente

Outras informações Membro do Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Atividades

02/2008 - Atual Atividades de Participação em Projeto, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.

Projetos de pesquisa
[Nutrigenômica: modulação das proteínas envolvidas na neoformação vascular por polifenóis da própolis](#)

Universidade Federal Fluminense, UFF, Brasil.

Vínculo institucional

2006 - 2008 Vínculo: Contratual, Enquadramento Funcional: Professor Auxiliar, Carga horária: 20

Vínculo institucional

2003 - 2004 Vínculo: Iniciação Científica, Enquadramento Funcional: Bolsista FAPERJ, Carga horária: 20, Regime:

Dedicação exclusiva.

Atividades

2002 - 2009 Atividades de Participação em Projeto, Centro de Ciências Médicas, Faculdade de Nutrição.

Projetos de pesquisa

[Avaliação da Soja Geneticamente Modificada sobre o crescimento e desenvolvimento de três gerações de ratos Wistar](#)

4/2006 - 4/2008 Ensino, Nutrição, Nível: Graduação.

Disciplinas ministradas

Dietoterapia

Dietoterapia Infantil

Práticas Integradas em Unidade Básica de Saúde

Seleção e Preparo de Alimentos

Supervisão da Prática Hospitalar em Pediatria

01/2006 - 04/2008 Extensão universitária , Centro de Ciências Médicas, .

Atividade de extensão realizada

Atendimento Ambulatorial/ Faculdade de Nutrição.

07/2006 - 03/2008 Extensão universitária , Centro de Ciências Médicas, .

Atividade de extensão realizada

Produção de um Manual Operacional para atividades relacionadas a produção de refeições na Universidade Federal Fluminense com base nas legislações vigentes.

2003 - 2008 Atividades de Participação em Projeto, Centro de Ciências Médicas, Faculdade de Nutrição.

Projetos de pesquisa

[Estudo comparativo das propriedades funcionais das variedades de soja Orgânica e transgênica com a semente de linhaça para aumentar a qualidade de vida desde adolescência até a velhice: estudo em ratos](#)

2002 - 2008 Atividades de Participação em Projeto, Centro de Ciências Médicas, Faculdade de Nutrição.

Projetos de pesquisa

[Avaliação Biológica e Bioquímica de Alimentos não Convencionais](#)

07/2007 - 12/2007 Ensino, Especialização em Nutrição Clínica, Nível: Especialização.

Disciplinas ministradas

Nutrição Clínica e Pediatria

Prática hospitalar em Nutrição Pediátrica

Mountain Creek, MOUNTAIN CREEK, Estados Unidos.

Vínculo institucional

2004 - 2005 Vínculo: Contratual, Enquadramento Funcional: Estagiário, Carga horária: 20

Grupo de Apoio Nutricional, GANUTRI, Brasil.

Vínculo institucional

2004 - 2004 Vínculo: Contratual, Enquadramento Funcional: Estagiário, Carga horária: 12

Projetos de Pesquisa

2003 - 2008 Estudo comparativo das propriedades funcionais das variedades de soja Orgânica e transgênica com a semente de linhaça para aumentar a qualidade de vida desde adolescência até a velhice: estudo em ratos

Descrição: O aumento da expectativa de vida e as crescentes informações levam o consumidor a procurar uma alimentação saudável para a prevenção e tratamento de doenças. Os avanços da ciência e tecnologia permitem um melhor conhecimento sobre as propriedades dos alimentos. Hoje, a soja não é considerada somente um alimento de alta qualidade protéica, mas tem papel como alimento funcional, pois, produz efeitos benéficos à saúde. É a principal fonte das isoflavonas que são compostos químicos fenólicos, pertencentes à classe dos fitoestrógenos amplamente distribuídas no reino vegetal, com concentrações relativamente maiores nas leguminosas. Tem havido um grande interesse nos fitoestrógenos, nos potenciais benefícios que estes compostos pode conferir no controle de muitas doenças crônicas. Trabalhos experimentais e epidemiológicos sugerem que as isoflavonas da soja podem proteger contra várias doenças crônicas, incluindo câncer, doença cardiovascular aterosclerótica, osteoporose, manifestações da menopausa e diabetes mellitus. A linhaça (*Linum usitatissimum*), no Brasil, a variedade mais comum é a semente de linhaça marrom, com alta concentração do ácido graxo α -linolênico (cerca de 60%), do grupo ω -3, e de lignana, uma fibra útil no processo digestivo que possuem ação estrogênica, muito semelhante as isoflavonas da soja. Na linhaça estão presentes ainda diversas substâncias com efeito benéfico como β -caroteno, vitamina E, glicosídeos, linamarina, taninos e mucilagem. As propriedades mais conhecidas do óleo de linhaça são a regularização do funcionamento do intestino, em especial no tratamento da prisão de ventre e na revitalização da pele. É indispensável que o

profissional conheça os alimentos, suas funções, quantidades recomendadas de ingestão e a biodisponibilidade, para incorporação destes à sua prática de prescrição dietética. O tema do presente estudo procura esclarecer todas essas questões relacionadas à utilização da semente de linhaça e comparando-a com a soja..

Situação: Concluído; *Natureza:* Pesquisa.

Integrantes: Mariana Sarto Figueredo - Integrante / Juliana Tomaz Pacheco - Integrante / Gilson Teles Boaventura - Coordenador / Maria Angélica Guzman Silva - Integrante / Carolina Meano de Brito - Integrante / Natalia Costa Cysneiros - Integrante / Joici Mendonça Muniz - Integrante / Aline Troina - Integrante / Vilma Blondet Azeredo - Integrante / Julio Beltrame Daleprane - Integrante.

Financiador(es): Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesq. do Estado do Rio de Janeiro - Auxílio financeiro..

2002 - 2008 Avaliação Biológica e Bioquímica de Alimentos não Convencionais

Descrição: Descrição: A situação de fome e desnutrição de parcela significativa da população brasileira vem ensejando a implementação de estratégias para o enfrentamento do problema, no âmbito disponibilidade de alimentos e de seu consumo. Dentre as estratégias, destaca-se a Alimentação Alternativa baseada em uma farinha múltipla denominada multimistura, composta de farelos de arroz e trigo; casca de ovo; sementes; e pó de folhas verdes. Segundo alguns estudiosos, tanto os farelos como as folhas utilizadas nesta multimistura possuem, na sua composição, substâncias antinutricionais e/ou tóxicas que podem inibir ou impedir a absorção de nutrientes para a manutenção da vida. Verificamos, ao tentar estudar os aspectos nutricionais e antinutricionais, que dispomos de poucos trabalhos científicos que avaliam estes aspectos da alimentação alternativa e, entre eles, principalmente, a biodisponibilidade de micronutrientes. A Secretaria de Saúde do Município de Quissamã, vem implementando, no atendimento ambulatorial à pacientes de baixo peso, o uso de uma multimistura básica. O aumento substancial do consumo de alimentos considerados alternativos neste país, exige da Comunidade Científica, o conhecimento de sua composição centesimal, de seus teores de vitaminas e de minerais e, principalmente, da presença de fatores antinutricionais que interferem na utilização da maioria dos nutrientes. Desta forma, torna-se importante estudar o aproveitamento dos nutrientes contidos nesta multimistura básica, utilizada no Município de Quissamã, permitindo, com isso, avaliar os efeitos químico, biológico e bioquímico que podem ocorrer com o uso de tal produto e seus componentes isolados, alimentando ratos recém desmamados, previamente desnutridos, através do coeficiente de eficácia protéica e do coeficiente digestibilidade..

Situação: Concluído; *Natureza:* Pesquisa.

Integrantes: TATIANA SILVEIRA FEIJÓ - Integrante / Mariana Sarto Figueredo - Integrante / Juliana Tomaz Pacheco - Integrante / Gilson Teles Boaventura - Coordenador / Julio Beltrame Daleprane - Integrante.

Financiador(es): Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesq. do Estado do Rio de Janeiro - Auxílio financeiro..

2002 - 2008 Avaliação da Soja Geneticamente Modificada sobre o crescimento e desenvolvimento de três gerações de ratos Wistar

Descrição: Introduzida no Brasil na década de 70, no Rio Grande do Sul e hoje tendo o Centro-Oeste como uma das principais regiões produtoras, a soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é o produto agrícola mais importante, em termos de contribuição de renda ao agricultor, ao PIB e às exportações. O grão da soja dá origem a produtos e subprodutos utilizados pela agroindústria de alimentos e indústria química, além de ser utilizado tanto na alimentação humana quanto na alimentação animal. As perspectivas indicam que a soja continuará sendo uma commodity cada vez mais estratégica para o Brasil, com demanda superior à produção prevista, dentro das atuais condições tecnológicas disponíveis, por ser forte na balança da nossa economia. A soja vem sendo estudada para que suas perdas com ervas daninhas e pragas possam ser cada vez menores. Uma tentativa desta diminuição de perdas é o uso de soja geneticamente modificada resistente ao herbicida Roundup Ready. Em estudos experimentais essa soja geneticamente modificada vem mostrando 10% mais de rendimento do que a soja convencional em plantios diretos, proporcionando um acréscimo de 4,93 sacas de 60 kg por hectare. O debate a cerca dos problemas ambientais e uso dos alimentos transgênicos fundamenta-se na falta de segurança alimentar que esses apresentam em relação à toxicologia, à microbiologia, à genética, e à bioquímica. Portando os alimentos geneticamente modificados (AGMs), necessitam de estudos longitudinais para saber se existe uma posterior agressão ao organismo com o tempo sem que os mesmos sejam influenciados por indústrias donas das patentes transgênicas. Com a polêmica sobre os alimentos transgênicos em alta, o presente trabalho visa produzir informações seguras e confiáveis para a sociedade que venham elucidar algumas questões levantadas, contribuindo na formação de opiniões sobre esses novos produtos..

Situação: Concluído; *Natureza:* Pesquisa.

Integrantes: TATIANA SILVEIRA FEIJÓ - Integrante / CAROLINA SARDINHA FOGEL - Integrante / Mariana Sarto Figueredo - Integrante / Juliana Tomaz Pacheco - Integrante / Gilson Teles Boaventura - Coordenador / Maria Angélica Guzman Silva - Integrante / Carolina Meano de Brito - Integrante / Natalia Costa Cysneiros - Integrante / Vilma Blondet Azeredo - Integrante / Mauricio Alves Chagas - Integrante / Cristiane Ramos - Integrante / Julio Beltrame Daleprane - Integrante.

Financiador(es): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Auxílio financeiro / Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesq. do Estado do Rio de Janeiro - Auxílio financeiro..

Nutrigenômica: modulação das proteínas envolvidas na neoformação vascular por polifenóis da própolis

Situação: Desativado; *Natureza:* Outra.

Integrantes: Julio Beltrame Daleprane - Coordenador.

Revisor de periódico

2008 - Atual Periódico: International Journal of Food Sciences and Nutrition

2010 - Atual Periódico: Food Research International

Áreas de atuação

1. *Grande área:* Ciências da Saúde / *Área:* Nutrição / *Subárea:* Bioquímica da Nutrição.
2. *Grande área:* Ciências Agrárias / *Área:* Ciência e Tecnologia de Alimentos / *Subárea:* Ciência de Alimentos / *Especialidade:* Valor Nutritivo de Alimentos.
3. *Grande área:* Ciências da Saúde / *Área:* Nutrição / *Subárea:* Nutrigenômica e Nutrigenética.

Idiomas

- Inglês** Compreende Bem, Fala Razoavelmente, Lê Bem, Escreve Razoavelmente.
- Espanhol** Compreende Razoavelmente, Fala Razoavelmente, Lê Razoavelmente.
- Francês** Compreende Razoavelmente, Fala Razoavelmente, Lê Razoavelmente, Escreve Razoavelmente.

Prêmios e títulos

- 2005** Classificação entre os 10 melhores trabalhos na área de Ciências da Saúde - 15 SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA e PRÊMIO UFF VASCONCELLOS TORRES DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA, Universidade Federal Fluminense.
- 2004** 2 Lugar no 14 SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA e PRÊMIO UFF VASCONCELLOS TORRES DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA, UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE.

Produção em C,T & A

Produção bibliográfica

Citações

Web of Science

Total de trabalhos	Total de citações	Fator H
8	5	2

Daleprane JB Data: 25/01/2011

SCOPUS

Total de trabalhos	Total de citações
6	4

Daleprane JB Data: 23/01/2007

Artigos completos publicados em periódicos

1. **PACHECO, Juliana Tomaz** ; Daleprane, Julio Beltrame ; **BOAVENTURA, Gilson Teles** . Impact of dietary flaxseed (Linum usitatissimum) supplementation on biochemical profile in healthy rats. *Nutrición Hospitalaria* **JCR** , v. 26, p. 798-802, 2011.
2. **DALEPRANE, Julio Beltrame** ; Chagas, MA ; Velarde, GC ; Ramos, C ; **BOAVENTURA, Gilson Teles** . The Impact of Non- and Genetically Modified Soybean Diets in Aorta Wall Remodeling. *Journal of Food Science* **JCR** , v. 75, p. T126-T131, 2010.
3. **DALEPRANE, Julio Beltrame** ; Batista, Aline ; **PACHECO, Juliana Tomaz** ; da Silva, Andréa F.E. ; Costa, Cristiane A. ; Resende, Ângela de Castro ; **BOAVENTURA, Gilson Teles** . Dietary flaxseed supplementation improves endothelial function in the mesenteric arterial bed. *Food Research International* **JCR** , v. 43, p. 2052-2056, 2010.
4. **FEIJÓ, Tatiana Silveira** ; Cardoso, TS ; DALEPRANE, Julio Beltrame ; SABAA-SRUR, A.O ; **BOAVENTURA, Gilson Teles** . Avaliação da influência da qualidade protéica da Soja Geneticamente modificada e Orgânica no crescimentos de duas gerações de Ratos Wistar. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária* **JCR** , v. 31, p. 139-144, 2009.
5. **DALEPRANE, Julio Beltrame** ; FEIJÓ, Tatiana ; **BOAVENTURA, Gilson Teles** . Organic and Genetically Modified Soybean Diets: Consequences in Growth and in Hematological Indicators of Aged Rats. *Plant Foods for Human Nutrition (Dordrecht)* **JCR** , v. 64, p. 1-5, 2009.
Citado 2 vezes no **SCOPUS**
6. **DALEPRANE, Julio Beltrame** ; **PACHECO, Juliana Tomaz** ; **BOAVENTURA, Gilson Teles** . Evaluation of protein quality from genetically modified and organic soybean in two consecutive generations of wistar rats. *Brazilian Archives of Biology and Technology (Impresso)* **JCR** , v. 52, p. 841-847, 2009.
Citado 2 vezes no **SCOPUS**
7. **PACHECO, Juliana Tomaz** ; DALEPRANE, Julio Beltrame ; **BOAVENTURA, Gilson Teles** . The effect of the alternative feeding in the biological and chemical pointers of rats in growth fed with the QUISSAMA S diet. *Revista Saúde.com*, v. 3, p. 35-47, 2007.

Textos em jornais de notícias/revistas

1. Daleprane, Julio Beltrame . Um Q de Saúde. Revista Saúde, Brasil, p. 16 - 19, 15 maio 2009.
2. DALEPRANE, Julio Beltrame . Operação Verão vai vistoriar comércio e produtos vendidos na orla de Niterói. O Fluminense, Niterói-RJ, 24 nov. 2007.

Trabalhos completos publicados em anais de congressos

1. DALEPRANE, Julio Beltrame . UTILIZAÇÃO DA PROTEÍNA DE SOJA ORGÂNICA NO CRESCIMENTO DE DUAS GERAÇÕES DE RATOS.. In: XIX CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS: ESTRATÉGIA PARA O DESENVOLVIMENTO, 2004, Recife-PE, 2004.
2. DALEPRANE, Julio Beltrame . PROTEÍNA DE SOJA, UMA ALTERNATIVA PARA RECUPERAR O ESTADO DE DESNUTRIÇÃO? AVALIAÇÃO ATRAVÉS DO PESO CORPORAL, DE FÍGADO E DE BAÇO.. In: 14 SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E PRÊMIO UFF VASCONCELLOS TORRES DE CIENCIA E TECNOLOGIA, 2004, NITERÓI. ANAIS DO 14 SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E PRÊMIO UFF VASCONCELLOS TORRES DE CIENCIA E TECNOLOGIA, 2004.

Resumos expandidos publicados em anais de congressos

1. BRITO, Carolina Meano de ; DALEPRANE, Julio Beltrame ; SOUZA, Fernanda Paulino de ; SOARES, Lavinia Leal ; LUCAS, Ana Maria Martins ; FEIJÓ, Tatiana . A INFLUÊNCIA DA SOJA GENETICAMENTE MODIFICADA E ORGÂNICA NA PREVENÇÃO E MANUTENÇÃO DA SAÚDE: ESTUDO EM RATOS MACHOS. In: 15 SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E PRÊMIO UFF VASCONCELLOS TORRES DE CIENCIA E TECNOLOGIA, 2005, Niterói. CD ROM do 15 SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E PRÊMIO UFF VASCONCELLOS TORRES DE CIENCIA E TECNOLOGIA, 2005.
2. SOUZA, Fernanda Paulino de ; DALEPRANE, Julio Beltrame ; BRITO, Carolina Meano de ; LUCAS, Ana Maria Martins ; SOARES, Lavinia Leal . NÍVEIS DE TRIGLICERÍDIOS DE RATOS ALIMENTADAS COM SOJA (Glycini Max. L. merril) ORGÂNICA E TRANSGÊNICA.. In: 15 SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E PRÊMIO UFF VASCONCELLOS TORRES DE CIENCIA E TECNOLOGIA, 2005, Niterói. CD ROM do 15 SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E PRÊMIO UFF VASCONCELLOS TORRES DE CIENCIA E TECNOLOGIA, 2005.
3. CYSNEIROS, Natalia Costa ; DALEPRANE, Julio Beltrame ; BRITO, Carolina Meano de ; SOUZA, Fernanda Paulino de ; MUNIZ, Joici Mendonça ; SOARES, Lavinia Leal . COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DAS RAÇÕES CASEINA E SOJA (Glycine Max L. merril) ORGÂNICA E GENETICAMENTE MODIFICADA.. In: 15 SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E PRÊMIO UFF VASCONCELLOS TORRES DE CIENCIA E TECNOLOGIA, 2005, Niterói. cd Rom 15 SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E PRÊMIO UFF VASCONCELLOS TORRES DE CIENCIA E TECNOLOGIA, 2005.
4. MUNIZ, Joici Mendonça ; DALEPRANE, Julio Beltrame ; SOUZA, Fernanda Paulino de ; LUCAS, Ana Maria Martins ; [PACHECO, Juliana Tomaz](#) ; BRITO, Carolina Meano de . COMPARAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA QUALIDADE PROTÉICA DA SEMENTE DE LINHAÇA (Linum Usitatissimum) E DE SOJA (Glycine Max L. merril) NO CRESCIMENTO DE RATOS NORMAIS. In: 15 SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E PRÊMIO UFF VASCONCELLOS TORRES DE CIENCIA E TECNOLOGIA, 2005, Niterói. CD ROM / 15 SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E PRÊMIO UFF VASCONCELLOS TORRES DE CIENCIA E TECNOLOGIA, 2005.

Resumos publicados em anais de congressos

1. Daleprane, Julio Beltrame ; DEHNE, N. ; Ong TP ; BRUENE, B. ; Abdalla DSP . Antiangiogenic properties of natural polyphenols from red propolis. In: Experimental Biology Meeting, 2011, Washington. Meeting Abstract Supplement, 2011. v. 25. p. IBL236.
2. Daleprane, Julio Beltrame ; Ong TP ; Ikegaki M ; MENRAD, H. ; GUEIS, T. ; SCHMID, T. ; DEHNE, N. ; Abdalla DSP . Polyphenols from Red Propolis Suppresses Angiogenesis Through Promoting Hypoxia-Inducible Factor-1alpha (HIF-1alpha) Degradation Dependent of Von Hippel-Lindau. In: 4th Congress of the International Society of Nutrigenetics/Nutrigenomics (ISNN), 2010, Pamplona, Espanha. Journal of Nutrigenetics and Nutrigenomics, 2010. v. 3. p. 77-77.
3. Daleprane, Julio Beltrame ; Ikegaki M ; Ong TP ; Salazar L ; Abdalla DSP . Anti-atherogenic and anti-angiogenic activities of polyphenols from propolis. In: 4th Congress of the International Society of Nutrigenetics/Nutrigenomics (ISNN), 2010, Pamplona, Espanha. Journal of Nutrigenetics and Nutrigenomics, 2010. v. 3. p. 80-81.
4. Freitas V ; Daleprane, Julio Beltrame ; Pacheco A ; Salazar L ; Rudnicki M ; Ikegaki M ; Ong TP ; Abdalla DSP . Effects of propolis polyphenol's supplementation on suppression of atherogenic lesion formation. In: Simpósio Anual de Pesquisas em Ciências Farmacêuticas, 2009, São Paulo. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2009.
5. Daleprane, Julio Beltrame ; Freitas V ; Pacheco A ; Rudnicki M ; Salazar L ; Ikegaki M ; Abdalla DSP . Poster Presentations Part II (pp. 431 528). In: International Congress of Nutrition, 2009, Bangkok. Annals of Nutrition & Metabolism. Basel : Karger AG. v. 55. p. 443.
6. Daleprane, Julio Beltrame ; Freitas V ; Pacheco A ; Salazar L ; Rudnicki M ; Ikegaki M ; Abdalla DSP . Polyphenols from Propolis Reduce Atherosclerosis in LDLr deficient Mice. In: VI Congress of the Society for Free Radical Biology and Medicine, 2009, Santiago - Chile. Annals of VI Meeting of SFRBM South American Group, 2009. p. 51.
7. LENZI, K. ; DALEPRANE, Julio Beltrame ; TROINA, A. ; Fernandes, F. S. ; CYSNEIROS, Natalia Costa ; MUNIZ, Joici Mendonça ; SILVA, Maria Angélica Guzman . Estudo Longitudinal de ratas alimentadas com ração tendo como fonte protéica a linhaça (Linum Usitatissimum): dados de crescimento. In: XXI Reunião Anual da Federação de Sociedade de Biologia Experimental, 2006, Águas de Lindóia-SP. Anais da XXI Reunião Anual da Federação de Sociedade de Biologia Experimental, 2006.
8. LENZI, K. ; Fernandes, F. S. ; TROINA, A. ; CYSNEIROS, Natalia Costa ; FIGUEREDO, Mariana Sarto ; [PACHECO, Juliana Tomaz](#) ; BRITO, Carolina Meano de ; MUNIZ, Joici Mendonça ; DALEPRANE, Julio Beltrame . Estudo Longitudinal de ratas alimentadas com ração à base da semente de Linhaça (Linum Usitatissimum): fibra alimentar. In: XXI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, 2006, Águas de Lindóia - SP. Anais da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2006.

9. DALEPRANE, Julio Beltrame ; MUNIZ, Joici Mendonça ; CYSNEIROS, Natalia Costa ; BRITO, Carolina Meano de ; Fernandes, F. S. ; LENZI, K. ; TROINA, A. ; AZEREDO, V. B. ; MOTTA, E. F. R. O. . Potencial protéico da Linhça (Linum Usitatissimum) para ração de ratos em rescimento. In: XXI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, 2006, Águas de Lindóia - SP. Anais da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2006.
10. MUNIZ, Joici Mendonça ; MOTTA, E. F. R. O. ; CYSNEIROS, Natalia Costa ; Fernandes, F. S. ; DALEPRANE, Julio Beltrame ; TROINA, A. ; LENZI, K. ; BRITO, Carolina Meano de ; [PACHECO, Juliana Tomaz](#) . Linhça como fonte protéica exclusiva: um estudo em ratos. In: XXI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, 2006, Águas de Lindóia - SP. Anais da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2006.
11. CYSNEIROS, Natalia Costa ; DALEPRANE, Julio Beltrame ; LUCAS, Ana Maria Martins ; FIGUEREDO, Mariana Sarto ; AZEREDO, V. B. . Glycine Max L. Merrill, soja orgânica e transgênica: estudo longitudinal do perfil lipídico da geração Fzero. In: XXI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, 2006, Águas de Lindóia - SP. Anais da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2006.
12. CYSNEIROS, Natalia Costa ; DALEPRANE, Julio Beltrame ; LUCAS, Ana Maria Martins ; FIGUEREDO, Mariana Sarto ; AZEREDO, V. B. . Glycine Max L. Merrill, soja orgânica e transgênica: estudo longitudinal do perfil lipídico da geração Fzero. In: XXI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, 2006, Águas de Lindóia - SP. Anais da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2006.
13. DALEPRANE, Julio Beltrame ; FEIJÓ, Tatiana ; LUCAS, Ana Maria Martins ; MOURA, A. S. . Perfil de glicose e insulina plasmática de ratos alimentados com duas variedades de soja. In: XXI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, 2006, Águas de Lindóia - SP. Anais da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2006.
14. LENZI, K. ; CYSNEIROS, Natalia Costa ; DALEPRANE, Julio Beltrame ; MUNIZ, Joici Mendonça ; Fernandes, F. S. ; BRITO, Carolina Meano de ; AZEREDO, V. B. ; [BOAVENTURA, Gilson Teles](#) ; MOTTA, E. F. R. O. ; [PACHECO, Juliana Tomaz](#) . Estudo comparativo da utilização da linhça com a soja orgânica e transgênica como fontes protéicas exclusivas durante o crescimentos de ratos. In: XXI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, 2006, Águas de Lindóia - SP. Anais da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2006.
15. DALEPRANE, Julio Beltrame ; MOTTA, E. F. R. O. ; [BOAVENTURA, Gilson Teles](#) . Avaliação do grau de conformidade do Laboratório de Nutrição Experimental da UFF, segundo a Instrução Normativa N 1 de 13 de Fevereiro de 2003 do MAPA, para elaboração de um plano de trabalho para a implantação de um sistema de garantia da qualidade. In: XIX Congresso Brasileiro de Nutrição, 2006, São Paulo - SP. Anais do XIX Congresso Brasileiro de Nutrição, 2006.
16. DALEPRANE, Julio Beltrame ; [BOAVENTURA, Gilson Teles](#) . A soja é uma alternativa a proteína animal?. In: XIX Congresso Brasileiro de Nutrição, 2006, São Paulo - SP. Anais do XIX Congresso Brasileiro de Nutrição, 2006.
17. NASSER, Emanuele ; LUCAS, Ana Maria Martins ; SOARES, Lavinia Leal ; DALEPRANE, Julio Beltrame ; FEIJÓ, Tatiana ; [BOAVENTURA, Gilson Teles](#) ; SILVA, Maria Angélica Guzman . Análise morfométrica de rim de ratos wistar durante a recuperação da desnutrição com soja. In: XXI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2006, Águas de Lindóia-SP. Anais da XXI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2006.
18. NASSER, Emanuele ; LUCAS, Ana Maria Martins ; SOARES, Lavinia Leal ; DALEPRANE, Julio Beltrame ; [FEIJÓ, Tatiana Silveira](#) ; [BOAVENTURA, Gilson Teles](#) ; SILVA, Maria Angélica Guzman . Efeito da Cistina no desenvolvimento renal de ratos Wistar recuperados de desnutrição com diferentes dietas à base de soja.. In: XXI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2006, Águas de Lindóia-SP. Anais do XXI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2006.
19. SILVA, Maria Angélica Guzman ; NASSER, Emanuele ; LUCAS, Ana Maria Martins ; SOARES, Lavinia Leal ; DALEPRANE, Julio Beltrame ; [FEIJÓ, Tatiana Silveira](#) ; [BOAVENTURA, Gilson Teles](#) . Liver and Kidney proliferation during the recovery from malnutrition with Organic and Transgenic soy. In: Experimental Biology (EB) Meeting at the Moscone Convention Center, 2006, San Francisco-California. Annals of Experimental Biology (EB) Meeting at the Moscone Convention Center, 2006. v. 20. p. A1089.
20. DALEPRANE, Julio Beltrame ; [PACHECO, Juliana Tomaz](#) ; BRITO, Carolina Meano de ; [BOAVENTURA, Gilson Teles](#) . A proteína da linhça substitui a proteína animal no crescimento?. In: XIV Congresso Latino Americano de Nutrición, 2006, Florianópolis-SC. Anais do XIV Congresso Latino Americano de Nutrición, 2006.
21. DALEPRANE, Julio Beltrame ; [BOAVENTURA, Gilson Teles](#) . Dieta à base de soja e suas consequencias no perfil lipidico. In: XIV Congresso Latino Americano de Nutrición, 2006, Florianópolis-SC. Anais do XIV Congresso Latino Americano de Nutrición, 2006.
22. NASSER, Emanuele ; LUCAS, Ana Maria Martins ; SOARES, Lavinia Leal ; DALEPRANE, Julio Beltrame ; FEIJÓ, Tatiana ; [BOAVENTURA, Gilson Teles](#) ; SILVA, Maria Angélica Guzman . PROLIFERAÇÃO CELULAR EM RIM DE RATO DURANTE A RECUPERAÇÃO DA DESNUTRIÇÃO COM SOJA. In: XX REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL - FeSBE, 2005, Águas de Lindóia-SP. cd-rom.
23. NASSER, Emanuele ; LUCAS, Ana Maria Martins ; SOARES, Lavinia Leal ; DALEPRANE, Julio Beltrame ; FEIJÓ, Tatiana ; SILVA, Maria Angélica Guzman . PROLIFERAÇÃO CELULAR EM FÍGADO DE RATO DURANTE A RECUPERAÇÃO DA DESNUTRIÇÃO COM SOJA.. In: XX REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL - FeSBE, 2005, ÁGUAS DE LINDÓIA-SP. CD-ROM.
24. DALEPRANE, Julio Beltrame ; LUCAS, Ana Maria Martins ; FIGUEREDO, Mariana Sarto . AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DA PROTEÍNA DA SOJA GENETICAMENTE MODIFICADA EM DUAS GERAÇÕES DE RATOS. ESTUDO LONGITUDINAL.. In: XVIII CONGRESSO BRASILEIRO DE NUTRIÇÃO, 2004, Campo Grande-MT. Anais do XVIII CONGRESSO BRASILEIRO DE NUTRIÇÃO, 2004.
25. FIGUEREDO, Mariana Sarto ; DALEPRANE, Julio Beltrame ; LUCAS, Ana Maria Martins . Hematócrito de ratos desnutridos e anêmicos, realimentados com soja orgânica e transgênica. In: XVII CONGRSSO BRASILEIRO DE NUTRIÇÃO, 2004, Campo Grande - MS. Anais do XVII CONGRSSO BRASILEIRO DE NUTRIÇÃO, 2004.

26. FIGUEREDO, Mariana Sarto ; DALEPRANE, Julio Beltrame ; [PACHECO, Juliana Tomaz](#) ; LUCAS, Ana Maria Martins . Avaliação da qualidade proteica da dieta de Quissamã/RJ adicionada da multimistura ou farelo de arroz.. In: XVIII CONGRESSO BRASILEIRO DE NUTRIÇÃO, 2004, Campo Grande - MS. Anais do XVIII CONGRESSO BRASILEIRO DE NUTRIÇÃO, 2004.
27. DALEPRANE, Julio Beltrame ; FIGUEREDO, Mariana Sarto ; LUCAS, Ana Maria Martins . AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DA PROTEÍNA DA SOJA GENETICAMENTE MODIFICADA EM DUAS GERAÇÕES DE RATOS. ESTUDO LONGITUDINAL.. In: XVIII CONGRESSO BRASILEIRO DE NUTRIÇÃO, 2004, Campo Grande, MS.
28. FOGEL, Carolina Sardinha ; DALEPRANE, Julio Beltrame ; [FEIJÓ, Tatiana Silveira](#) . VALOR DE LACTANCIA DE RATAS COM DIETA À BASE DE SOJA ORGÂNICA. In: VII CONGRESSO BRASILEIRO DE SAÚDE COLETIVA, 2003, BRASÍLIA. LIVROS DE RESUMOS 1, 2003. v. 8. p. 872-872.
29. FIGUEREDO, Mariana Sarto ; DALEPRANE, Julio Beltrame ; MENDES, Andréa Barcellos ; COSTA, Fernanda dos Santos . A UTILIZAÇÃO DE ALIMENTOS ALTERNATIVOS POR LONGOS PERÍODOS DIMINUI A DIGESTIBILIDADE PROTEICA. In: XVII REUNIÃO ANUAL DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL-FeSBE, 2003, PINHAIS. Programa e resumos da XVIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental -, 2003.
30. DALEPRANE, Julio Beltrame ; [PACHECO, Juliana Tomaz](#) ; [FEIJÓ, Tatiana Silveira](#) ; FOGEL, Carolina Sardinha ; COSTA, Fernanda dos Santos ; SILVA, Cristiane Francisca da . COEFICIENTE DE EFICÁCIA PROTEICA AVALIANDO A PROTEÍNA DE SOJA (Glycine max L. Merrill) ORGÂNICA E TRANSGÊNICA NA GERAÇÃO F1 DE RATOS.. In: 5º SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS, 2003, CAMPINAS. CDROOM. 2003, 2003.
31. [PACHECO, Juliana Tomaz](#) ; DALEPRANE, Julio Beltrame ; [FEIJÓ, Tatiana Silveira](#) ; FOGEL, Carolina Sardinha ; COSTA, Mariana Ribeiro . ESTUDO COMPARATIVO DA UTILIZAÇÃO DA RAÇÃO À BASE DE SOJA ORGÂNICA (Glycine Max L. merril) EM RATOS NORMAIS E DESNUTRIDOS. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ALIMENTAÇÃO E NUTRIÇÃO, 2003, Belo Horizonte. Livro de Programa e Resumos do 7º Congresso da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição, 2003. p. 158-158.
32. DALEPRANE, Julio Beltrame ; COSTA, Fernanda dos Santos ; SILVA, Cristiane Francisca da ; COSTA, Mariana Ribeiro . ESTUDO COMPARATIVO EM RATOS NORMAIS E DESNUTRIDOS ALIMENTADOS COM RAÇÃO À BASE DE SOJA (Glycine Max L. merril) ORGÂNICA OU TRANSGÊNICA. In: 7º CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ALIMENTAÇÃO E NUTRIÇÃO. In: 7º CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ALIMENTAÇÃO E NUTRIÇÃO, 2003, Belo Horizonte. Livro de Programa e Resumos do 7º Congresso da Sociedade Brasileira d, 2003. p. 158-158.
33. MENDES, Andréa Barcellos ; DALEPRANE, Julio Beltrame ; FIGUEREDO, Mariana Sarto . INDUÇÃO DA HIPERCOLESTEROLEMIA EM RATOS, USANDO A GEMA DE OVO. In: XVIII REUNIÃO ANUAL DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL-FeSBE, 2003, Pinhais. Programa e resumos da XVIII Reunião Anual de Sociedades de Biologia Experimental - FESBEE, 2003.
34. DALEPRANE, Julio Beltrame ; [PACHECO, Juliana Tomaz](#) ; FOGEL, Carolina Sardinha ; SILVA, Cristiane Francisca da ; COSTA, Fernanda dos Santos ; [FEIJÓ, Tatiana Silveira](#) . RATOS DESNUTRIDOS DA GERAÇÃO F1 ALIMENTADOS COM SOJA (Glycine Max L. merril) ORGÂNICA CONSEGUEM SE IGUALAR A RATOS NORMAIS? . In: 5º SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS, 2003, Campinas. CD-ROM do 5º SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS, 2003.
35. DALEPRANE, Julio Beltrame ; FOGEL, Carolina Sardinha ; [FEIJÓ, Tatiana Silveira](#) . RATOS NORMAIS E DESNUTRIDOS ALIMENTADOS COM RAÇÃO À BASE DE SOJA (Glycine Max L. merril) TRANSGÊNICA : ESTUDO COMPARATIVO . In: 7º CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ALIMENTAÇÃO E NUTRIÇÃO, 2003, Belo Horizonte. Livro de Programa e Resumos do 7º CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ALIMENTAÇÃO E NUTRIÇÃO, 2003. v. unico. p. 158-158.
36. DALEPRANE, Julio Beltrame . RECUPERAÇÃO DO ESTADO DE DESNUTRIÇÃO DA GERAÇÃO F1 COM A PROTEÍNA DA SOJA: ANÁLISE BIOLÓGICA . In: 5º SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS, 2003, Campinas. CD-ROM do 5º SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS, 2003.
37. DALEPRANE, Julio Beltrame ; [FEIJÓ, Tatiana Silveira](#) ; FOGEL, Carolina Sardinha ; COSTA, Fernanda dos Santos . RETENÇÃO PROTEICA DE RATOS UTILIZANDO A SOJA (Glycine Max L. merril) COMO FONTE PROTEICA. . In: XVIII REUNIÃO ANUAL DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL-FeSBE, 2003, Pinhais. Programa e resumos da XVIII REUNIÃO ANUAL DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL-FeSBE, 2003.
38. DALEPRANE, Julio Beltrame ; FOGEL, Carolina Sardinha ; SILVA, Cristiane Francisca da ; COSTA, Fernanda dos Santos ; [PACHECO, Juliana Tomaz](#) ; [FEIJÓ, Tatiana Silveira](#) . RETENÇÃO PROTEICA FINAL (RPF) DE RATOS NORMAIS DA GERAÇÃO F1, ALIMENTADOS COM SOJA ORGÂNICA E TRANSGÊNICA (Glycine Max L. merril) . In: 5º SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS, 2003, Campinas. CD-ROM do 5º SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS, 2003.
39. DALEPRANE, Julio Beltrame ; FOGEL, Carolina Sardinha ; [FEIJÓ, Tatiana Silveira](#) . SOJA ORGÂNICA E TRANSGÊNICA COMO FONTE PROTEICA NO CRESCIMENTO DE RATOS RECÉM DESMAMADOS . In: 7º CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ALIMENTAÇÃO E NUTRIÇÃO, 2003, Belo Horizonte. Livro de programa e resumos do 7º CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ALIMENTAÇÃO E NUTRIÇÃO, 2003.
40. MATTOS, Anna Carolina Leite ; DALEPRANE, Julio Beltrame ; CARVALHO, Laura Kawakami ; CADENA, Rafael ; FROTA, Ana Paula Manarino da ; AMORIM, Bruno Fernandes . NOÇÕES DE SEGURANÇA ALIMENTAR PARA MANIPULADORES DE ALIMENTOS. In: XII Jornada da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal Fluminense, 2003, Niterói. Anais da XII Jornada da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal Fluminense, 2003.
41. DALEPRANE, Julio Beltrame . Os níveis de colesterol total em ratas alimentadas com ração à base de Soja Geneticamente Modificada. In: XIII Seminário de Iniciação Científica e Prêmio UFF Vasconcellos Torres de Ciência e Tecnologia, 2003, Niterói. anais do XIII Seminário de Iniciação Científica e Prêmio UFF Vasconcellos Torres de Ciência e Tecnologia, 2003.
42. DALEPRANE, Julio Beltrame ; MALHEIROS, Luciana Reis ; SIQUARA, Karine . TRATAMENTO FARMACOLÓGICO DA OBESIDADE. In: VI SEMANA DE MONITORIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE, 2002, NITERÓI. ANAIS DA VI SEMANA DE MONITORIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE, 2002.
43. DALEPRANE, Julio Beltrame ; MALHEIROS, Luciana Reis ; SIQUARA, Karine . ÁLCOOL, MACONHA E NICOTINA: AÇÕES

FARMACOLÓGICAS. In: VI SEMANA DE MONITORIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE, 2002, NITERÓI, 2002.

Artigos aceitos para publicação

1. Pacheco A ; DALEPRANE, Julio Beltrame ; Freitas V ; Ferderbar S ; Abdalla DSP ; Salazar L . Efecto del propoleos sobre el metabolismo de glucosa en ratones diabéticos. International Journal of Morphology (Print), 2011.
2. 🌟 DALEPRANE, Julio Beltrame ; Freitas V ; Pacheco A ; Rudnicki M ; Faine, LA ; Dörr, FA ; Ikegaki M ; Ong TP ; Abdalla DSP . Anti-atherogenic and anti-angiogenic activities of polyphenols from propolis. Journal of Nutritional Biochemistry ^{JCR}, 2011.

Apresentações de Trabalho

1. DALEPRANE, Julio Beltrame ; Ikegaki M ; Ong TP ; Salazar L ; Abdalla DSP . Anti-atherogenic and anti-angiogenic activities of polyphenols from propolis. 2011. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
2. DALEPRANE, Julio Beltrame ; Ong TP ; Ikegaki M ; MENRAD, H. ; GUEIS, T. ; SCHMID, T. ; DEHNE, N. ; B, B. ; Abdalla DSP . Polyphenols from Red Propolis Suppresses Angiogenesis Through Promoting Hypoxia-Inducible Factor-1alpha (HIF-1alpha) Degradation Dependent of Von Hippel-Lindau. 2011. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
3. 🌟 Daleprane, Julio Beltrame ; Freitas V ; Pacheco A ; Rudnicki M ; Salazar L ; Ikegaki M ; Abdalla DSP . POLYPHENOLS FROM PROPOLIS: POTENTIAL INHIBITORS OF ANGIOGENESIS. 2009. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
4. DALEPRANE, Julio Beltrame ; PACHECO, S. ; GODOY, R. L. O. ; OIANO NETO, J. . Dieta à base de soja e suas consecuencias no perfil lipidico. 2006. (Apresentação de Trabalho/Comunicação).
5. DALEPRANE, Julio Beltrame ; BRITO, Carolina Meano de ; [PACHECO, Juliana Tomaz](#) . A proteína da semnte de Linhaça substitui a proteína animal no crescimento?. 2006. (Apresentação de Trabalho/Comunicação).

Bancas

Participação em bancas examinadoras

Monografias de cursos de aperfeiçoamento/especialização

1. do Valle ; DALEPRANE, Julio Beltrame. Participação em banca de Omara Machado Araujo de Oliveira. Fatores de risco para o desenvolvimento de Doenças Cardiovasculares em Adolescentes de escolas Públicas de Niterói -RJ. 2007. Monografia (Aperfeiçoamento/Especialização em Especialização em Nutrição Clínica) - Universidade Federal Fluminense.

Trabalhos de Conclusão de Curso de graduação

1. JARDIM, Maria de Fátima de Barros ; Thomaz Barcelos ; DALEPRANE, Julio Beltrame. Participação em banca de Amine Farias Costa. Gasto energético total diário em universidades de Niterói/RJ. 2007. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Nutrição) - Universidade Federal Fluminense.
2. DALEPRANE, Julio Beltrame. Participação em banca de Emanuelle de Matos Nasser. Avaliação morfológica e morfoiométrica do rim na recuperação da desnutrição em ratos Wistar mediante soja orgânica e soja geneticamente modificada adicionadas ou não de cistina. 2007. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Nutrição) - Universidade Federal Fluminense.
3. DALEPRANE, Julio Beltrame. Participação em banca de Keila da Silva Eller. Avaliação morfológica e morfoiométrica do fígado na recuperação da desnutrição em ratos Wistar mediante soja orgânica e soja geneticamente modificada adicionadas ou não de cistina. 2007. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Nutrição) - Universidade Federal Fluminense.
4. COSTA, Virgínia Alice Vieira da ; DALEPRANE, Julio Beltrame. Participação em banca de Carolina Meano de Brito. A linhaça (linum usitatissimum) como fonte protéica durante o crescimento de ratos machos recém desmamados: Estudo piloto.. 2006. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Nutrição) - Universidade Federal Fluminense.
5. COSTA, Virgínia Alice Vieira da ; DALEPRANE, Julio Beltrame. Participação em banca de Juliana Tomaz Pacheco. A linhaça (linum usitatissimum) como fonte protéica durante o crescimento de ratos machos recém desmamados: Estudo piloto.. 2006. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Nutrição) - Universidade Federal Fluminense.
6. CRUZ, Wanise de Souza ; LOBATO, Jackeline ; DALEPRANE, Julio Beltrame. Participação em banca de Silvana Palheta de Souza. Galactosemia. 2006. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Nutrição) - Universidade Federal Fluminense.
7. [BOAVENTURA, Gilson Teles](#) ; JARDIM, Maria de Fátima de Barros ; DALEPRANE, Julio Beltrame. Participação em banca de Sabrina da Silva Dias. Avaliação do queijo Mozzarella de Búfala em comparação ao de vaca influenciando os índices bioquímicos e biológicos de ratos desnutridos. 2006. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Nutrição) - Universidade Federal Fluminense.
8. [BOAVENTURA, Gilson Teles](#) ; DALEPRANE, Julio Beltrame. Participação em banca de Gabriela Fernandes Samico. Avaliação de um novo modelo de indução de Hipercolesterolemia em ratos Wistar. 2006. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Nutrição) - Universidade Federal Fluminense.

Eventos

Participação em eventos

1. Experimental Biology Meeting. Antiangiogenic properties of natural polyphenols from red propolis. 2011. (Congresso).
2. IV Congress of the International Society for Nutrigenetics/Nutrigenomics ISNN. Anti-atherogenic and anti-angiogenic activities of polyphenols from propolis. 2011. (Congresso).
3. 19th International Congress of Nutrition. Nutrition Security for All. 2009. (Congresso).
4. XIV Congresso Latino Americano de Nutrición. Dieta à base de soja e suas consequências no perfil lipídico. 2006. (Congresso).
5. 15 SEMIÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E PRÊMIO UFF VASCONCELLOS TORRES DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA. 15 SEMIÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E PRÊMIO UFF VASCONCELLOS TORRES DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA. 2005. (Seminário).
6. XIX CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS: ESTRATÉGIA PARA O DESENVOLVIMENTO. XIX CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS: ESTRATÉGIA PARA O DESENVOLVIMENTO. 2004. (Congresso).
7. VI SEMINÁRIO DE NUTRIÇÃO EM SAÚDE COLETIVA: TENDÊNCIAS E DESAFIOS. VI SEMINÁRIO DE NUTRIÇÃO EM SAÚDE COLETIVA. 2004. (Seminário).
8. 14 SEMIÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E PRÊMIO UFF VASCONCELLOS TORRES DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA. 14 SEMIÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E PRÊMIO UFF VASCONCELLOS TORRES DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA. 2004. (Seminário).
9. XVII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental-FeSBE. XVII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental-FeSBE. 2003. (Congresso).
10. VII Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição. VII Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição. 2003. (Congresso).
11. V Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos-SLACA. V Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos. 2003. (Simpósio).
12. XX Encontro Nacional dos Estudantes de Nutrição. XX Encontro Nacional dos Estudantes de Nutrição. 2003. (Encontro).
13. I Seminário Científico dos Estudantes de Nutrição da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal Fluminense. Transtornos Alimentares e Obesidade. I Seminário Científico dos Estudantes de Nutrição da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal Fluminense. Transtornos Alimentares e Obesidade. 2002. (Seminário).
14. XIX Encontro Nacional dos Estudantes de Nutrição. XIX Encontro Nacional dos Estudantes de Nutrição. 2002. (Encontro).
15. XVIII Encontro Nacional dos Estudantes de Nutrição. XVIII Encontro Nacional dos Estudantes de Nutrição. 2001. (Encontro).

Organização de eventos

1. Daleprane, Julio Beltrame. XIV Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia da FCF/USP. 2009. (Outro).

Orientações**Supervisões e orientações concluídas****Monografia de conclusão de curso de aperfeiçoamento/especialização**

1. Lincoln Soares. Benefícios da utilização da soja na prevenção e/ou terapêutica em doenças crônicas. 2007. Monografia. (Aperfeiçoamento/Especialização em Especialização em Nutrição Clínica) - Universidade Federal Fluminense. Orientador: Julio Beltrame Daleprane.
2. Juliana Tomaz Pacheco. Perfil metabólico de ratos alimentados com a semente da Linhaça. 2007. Monografia. (Aperfeiçoamento/Especialização em Especialização em Nutrição Clínica) - Universidade Federal Fluminense, Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesq. do Estado do Rio de Janeiro. Orientador: Julio Beltrame Daleprane.
3. Aline Batista. Efeitos do consumo da Linhaça na Reatividade Vascular no Leito Vascular Mesentérico de ratos Wistar. 2006. Monografia. (Aperfeiçoamento/Especialização em Nutrição) - Universidade Federal Fluminense, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Orientador: Julio Beltrame Daleprane.

Trabalho de conclusão de curso de graduação

1. Sammia de Oliveira Serqueira. Estado Nutricional relativo a zinco em pacientes hemodializados. 2007. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Nutrição) - Universidade Federal Fluminense, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e

Tecnológico. Orientador: Julio Beltrame Daleprane.

2. Joici Muniz. Avaliação de dietas com proteínas vegetais, ricas em fibras e gorduras, no crescimento e número de prole de ratos Wistar. 2006. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Nutrição) - Universidade Federal Fluminense. Orientador: Julio Beltrame Daleprane.
3. Kyria Oliveira Manhães. Avaliação de dietas com proteínas vegetais, ricas em fibras e gorduras, no crescimento e número de prole de ratos Wistar. 2006. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Nutrição) - Universidade Federal Fluminense. Orientador: Julio Beltrame Daleprane.

Página gerada pelo Sistema Currículo Lattes em 08/06/2011 às 11:04:24