

UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**ESTUDO HISTOMORFOLÓGICO DO EFEITO DE MEMBRANAS DE
COLÁGENO CONTENDO PRÓPOLIS VERMELHA SOBRE O
PROCESSO DE REPARO CICATRICIAL POR SEGUNDA INTENÇÃO
EM RATOS**

ANDRÉ LUIZ SANTOS BARRETO

ARACAJU
MARÇO - 2008

UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**ESTUDO HISTOMORFOLÓGICO DO EFEITO DE MEMBRANAS DE
COLÁGENO CONTENDO PRÓPOLIS VERMELHA SOBRE O
PROCESSO DE REPARO CICATRICIAL POR SEGUNDA INTENÇÃO
EM RATOS**

Dissertação de Mestrado submetida à banca examinadora como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Saúde e Ambiente, na área de concentração em Saúde e Ambiente.

ANDRÉ LUIZ SANTOS BARRETO

Orientador: Prof. Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior, D.Sc.
Profa. Juliana Cordeiro Cardoso, D.Sc.

ARACAJU
MARÇO - 2008

Ficha catalográfica: Delvânia Rodrigues dos Santos Macêdo
CRB – 5/1425

B273e Barreto, André Luiz Santos.

Estudo histomorfológico do efeito de membranas de colágeno contendo própolis vermelha sobre o processo de reparo cicatricial por segunda intenção em ratos/ André Luiz Santos Barreto ; orientação [de] Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior, Juliana Cordeiro Cardoso. – Aracaju : UNIT, 2008.

95 p. : il. ; 30 cm

Dissertação(Mestrado em Saúde e Ambiente) – Universidade Tiradentes

1. Própolis vermelha. 2. Experiências em ratos. 3. Membranas de colágeno – estudo histomorfológico I. Albuquerque Júnior, Ricardo Luiz Cavalcanti de(orient.) II. Cardoso, Juliana Cordeiro (orient.). III. Título

Estudo histomorfológico do efeito de membranas de colágeno contendo própolis vermelha sobre o processo de reparo cicatricial por segunda intenção em ratos.

ANDRÉ LUIZ SANTOS BARRETO

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE DA UNIVERSIDADE TIRADENTES, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM SAÚDE EM AMBIENTE.

Aprovada por:

Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior, D.Sc.
Orientador

Juliana Cordeiro Cardoso, D.Sc.
Orientador

Vera Lúcia Côrrea Feitosa, D.Sc.
1º. Examinador

Francisco Prado Reis, D.Sc.
2º. Examinador

Adriano Antunes de Sousa Araújo, D.Sc.
1º. Suplente

Ricardo Fakhouri, D.Sc.
2º. Suplente

Aracaju
Março - 2008

Dedico esse trabalho:

**À minha esposa Marília
pela compreensão, amor e
estímulo durante todo o
curso e ao nosso filho
Bernardo por nos mostrar o
real sentido da vida.**

Agradecimentos

- ✓ A Deus, pela presença constante e marcante na minha caminhada.
- ✓ Aos meus pais, Geraldo e Mércia, pelo estímulo que sempre me dedicaram durante toda essa minha jornada acadêmica.
- ✓ Aos meus sogros Pedro Mário e Rosemary pela acolhida e amor dispensados a mim.
- ✓ Ao meu orientador, Prof. Ricardo Albuquerque, pela paciência, responsabilidade e pela confiança em mim depositada.
- ✓ À minha orientadora Profa. Juliana Cordeiro pela humildade, compreensão e disponibilidade em ajudar.
- ✓ À Profa. Maria Amália Gonzaga Ribeiro pelos ensinamentos, sobretudo nos experimentos com ratos, amizade e dedicação.
- ✓ À Sra. Rosineli (técnica do Laboratório de Morfologia) pelo auxílio dispensado.
- ✓ À Dra Cristiane Soares (Biomédica) pela ajuda na parte histológica (macroscopia e microscopia) das lâminas.
- ✓ Aos funcionários do Biotério da UNIT (Sr. João, Gladston e Max) pela dedicação e, principalmente, pelo profissionalismo e cuidado com os animais.
- ✓ Aos colegas do Curso, em especial Anderson e Felipe, pelos momentos incríveis que vivenciamos juntos.
- ✓ Aos estagiários do LBME, em especial a Jônatas e Vítor, pela ajuda e compromisso firmados.

Muito Obrigado!

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	16
1.1 – OBJETIVOS	18
1.1.1 – Objetivo geral	18
1.1.2 – Objetivos específicos	18
2 - CAPÍTULO I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1- Cicatrização	19
2.2- Colágeno	22
2.3- Própolis	24
REFERÊNCIAS	28
3 - CAPÍTULO II - Avaliação do processo cicatricial por segunda intenção em ratos tratados com membranas de colágeno contendo própolis vermelha.	34
3.1 – Resumo	35
3.2 – Abstract	36
3.3 – Introdução	37
3.4 – Material e Métodos	39
3.5 – Resultados	43
3.6 - Discussão	51
REFERÊNCIAS	58
4 – CAPÍTULO III - Análise quantitativa da população de mastócitos durante a cicatrização de feridas tratadas com membranas de colágeno contendo própolis vermelha.	62
4.1 – Resumo	63
4.2 – Abstract	64
4.3 – Introdução	65
4.4 – Material e Métodos	66
4.5 – Resultados	68
4.6 - Discussão	70
REFERÊNCIAS	73
5 – CAPÍTULO IV - Estudo do padrão de deposição de fibras colágenas durante a cicatrização de feridas tratadas com membranas de colágeno contendo própolis vermelha.	76
5.1 – Resumo	77
5.2 – Abstract	78
5.3 – Introdução	79
5.4 – Material e Métodos	81
5.5 – Resultados	83
5.6 - Discussão	88

REFERÊNCIAS	92
CONCLUSÕES GERAIS	95

Lista de Tabelas

Tabela 1: Análise morfológica da reação inflamatória nos grupos controle (G1), tratados com membrana de colágeno (G2) e tratados com membrana de colágeno contendo própolis (G3) sacrificados ao sétimo dia após a experimentação cirúrgica.	44
Tabela 2. Análise morfológica da reação inflamatória nos animais pertencentes aos grupos controle (G1), tratados com membrana de colágeno (G2) e tratados com membrana de colágeno contendo própolis (G3) sacrificados ao décimo quarto dia após a experimentação cirúrgica.	46
Tabela 1. Distribuição dos valores médios de mastócitos nas margens e profundidade da área de reparo cicatricial nos diversos grupos sacrificados ao sétimo dia após os procedimentos cirúrgicos.	69

Lista de Figuras

CAPÍTULO 3

Figura 1. (A) Intensa infiltração neutrofílica superficial e linfocítica na profundidade, com proeminente edema intersticial (B) em G1; redução do edema e infiltração linfocítica em G2 (C e D); reação de granulação exuberante e proliferação fibroblástica evidente em G3 (E e F) (HE, 100x). 45

Figura 2. Reação inflamatória linfoplasmocitária residual em G1 (A), acompanhada de rico leito vascular (B); Os grupos G2 (C e D) e G3 (E e F) mostram ambos escassa infiltração leucocitária residual e tecido cicatricial fibroso bem formado (HE, 100x). 47

Figura 3. Distribuição dos índices percentuais médios de reepitelização da superfície das feridas ao sétimo dia nos três grupos estudados. 48

Figura 4. Distribuição dos índices percentuais médios de reepitelização da superfície das feridas ao sétimo dia nos três grupos estudados. 48

Figura 5. Fotomicrografias das feridas cirúrgicas exibindo reepitelização ainda incompleta em G1 (A), G2 (B) e G3 (C) em sete dias. Ao décimo quarto dia, apenas G4 (D) houve espécimes com reepitelização incompleta, enquanto que G5 (E) e G6 (F) demonstraram total reepitelização da superfície da ferida (HE, 40x). 49

Figura 6. Análise quantitativa do número médio de vasos sanguíneos por campo histológico nos grupos sacrificados sete dias após os procedimentos cirúrgicos. 50

Figura 7. Análise quantitativa do número médio de vasos sanguíneos por campo histológico nos grupos sacrificados catorze dias após os procedimentos cirúrgicos. 50

Figura 8. Análise quantitativa do perímetro vascular médio nos grupos sacrificados sete dias após os procedimentos cirúrgicos. 51

Figura 9. Análise quantitativa do perímetro vascular médio nos grupos sacrificados catorze dias após os procedimentos cirúrgicos. 51

CAPÍTULO 4

Figura 1. Em (A) observam-se mastócitos metacromáticos (violetas) na profundidade da área de reparo cicatricial (G3) exibindo morfologia ovalada (seta) e alongada (seta pontilhada). Em (B) evidenciam-se mastócitos assumindo disposição periférica a uma fibra nervosa (FbN) (Azul de Toluidina, 100X). 68

Figura 2. Distribuição dos valores médios da população de mastócitos entre os grupos estudados, mostrando que tanto em 7 quanto 14 dias, havia predomínio destas células nas margens da área de reparo cicatricial, independente do tratamento adotado. 69

CAPÍTULO 5

Figura 1. Grupo G1 apresenta escassa colagenização na superfície (A) e profundidade (B), enquanto G2 (C) e G3 (D) exibem feixes eosinofílicos delgados e delicados de colágeno, um pouco mais aparentes no último grupo (HE, 200x). 83

Figura 2. Sob luz polarizada, G1 exhibe escassos feixes fibrosos curtos, esverdeados e amarelo-esverdeados (colágeno tipo III), com abundância de espaços interfibrilares (A e B). Em G2 (C e D) os feixes se apresentam mais longos, com algumas fibras já exibindo birrefringência amarelo-alanjado e avermelhada (colágeno tipo I imaturo). Em G3, observam-se feixes fibrosos mais densos e espessos, com disposição paralela bem estruturada (E) e, por vezes, circundando vasos sanguíneos (F) (Picrossírius, 200x). 85

Figura 3. Região profunda da derme normal exibindo feixes espessos, grosseiros e entrelaçados de fibras colágenas (A). Em G4 e G5, o colágeno neoformado é aparentemente delicado e ondulado (B e C, respectivamente), embora os feixes pareçam mais aparentes no último grupo. Já em G6, os feixes fibrosos se apresentam um pouco mais espessos (HE, 200x). 86

Figura 4. Fotomicrografias dos espécimes corados em Picrossírius, observados sob luz polarizada. Grupo controle (G4) exibindo feixes colagênicos paralelos, com birrefringência amarelo-alaranjadas, que se apresentavam mais escassas na região superficial central (A) (100x). Detalhe da figura anterior mostrando a persistência de fibrilas esverdeadas delgadas na zona de retardo do reparo (B) (200x). O Grupo G5 mostra reparação colagênica composta por feixes amarelados e espessos e feixes avermelhados delicados, com disposição predominantemente paralela à superfície da área cicatricial (C, 100x; D, 200x). No grupo G6, os espaços interfibrilares são menos conspícuos, as fibrilas avermelhadas mais abundantes e o padrão arquitetural levemente entrelaçado (E, 100x; F, 200x). As fotomicrografias G (100x) e H (200x) mostram a derme normal, para comparação. 87

Lista de Siglas e Abreviações

V	Vimentina
VD	vimentina e desmina
VA	vimentina e alfa-actina
VDA	vimentina, desmina e alfa-actina
CAPE	éster fenílico do ácido cafeico
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
UNIT	Universidade Tiradentes
ITP	Instituto de Tecnologia e Pesquisa
GL	Gay-Lussac
HE	Hematoxilina/Eosina
Ep	percentual de epitelização
E _{ex}	epitélio neoformado
E _T	extensão total da ferida cirúrgica
PROBIC	Programa de Bolsas de Iniciação Científica
PIBIC	Programa Institucional de Bolsas de Bolsa de Iniciação Científica
G1	Grupo controle com sacrifício aos 07 dias
G2	Grupo tratado com membrana de colágeno com sacrifício aos 07 dias
G3	Grupo tratado com membrana de colágeno e própolis com sacrifício aos 07 dias
G4	Grupo controle com sacrifício aos 14 dias
G5	Grupo tratado com membrana de colágeno com sacrifício aos 14 dias
G6	Grupo tratado com membrana de colágeno e própolis com sacrifício aos 14 dias

ESTUDO HISTOMORFOLÓGICO DO EFEITO DE MEMBRANAS DE COLÁGENO CONTENDO PRÓPOLIS VERMELHA SOBRE O PROCESSO DE REPARO CICATRICIAL POR SEGUNDA INTENÇÃO EM RATOS.

André Luiz Santos Barreto

A própolis é uma substância resinosa balsâmica de consistência viscosa e cor variada, produzida por abelhas (*Apis mellifera L.*), cujas propriedades terapêuticas dependem da origem botânica, localização geográfica e procedência. Extratos hidroalcoólicos da própolis têm sido utilizados em diferentes situações como agentes antimicrobianos, antiinflamatórios e cicatrizantes em ferimentos orais e da pele. Apesar das propriedades da própolis verde convencional estarem sendo amplamente discutidas na literatura contemporânea, estudos sobre a variedade regional característica do estado de Sergipe, a própolis vermelha, são ainda extremamente escassos. O colágeno tipo I bovino reconstituído tem sido amplamente utilizado como biomaterial, no âmbito da saúde, em uma vasta gama de condições clínicas, e pode ser dispensado em diversas formas, como filmes (membranas) e esponjas. Assim, o objetivo deste trabalho consistiu em realizar um estudo histomorfológico do efeito de membranas de colágeno contendo extratos de própolis vermelha sobre o processo de reparo cicatricial por segunda intenção, em modelo murino. Para tanto, extratos hidroalcoólicos de própolis vermelha foram incorporados a filmes bioativos, preparados a partir de colágeno I extraído de tendão bovino, e aplicados sobre feridas cirúrgicas padronizadas previamente confeccionadas em dorso de ratos. Os animais foram distribuídos em seis grupos (n=5): G1 e G4– animais sem tratamento sacrificados em 7 e 14 dias; G2 e G5– animais tratados com membrana de colágeno sacrificados em 7 e 14 dias; G3 e G6– animais tratados com membrana de colágeno contendo própolis vermelha sacrificados em 7 e 14 dias. Os espécimes removidos foram fixados, processados e emblocados em parafina e secções histológicas foram coradas em HE, azul de toluidina e Picrossírius. As variáveis analisadas foram: o padrão inflamatório, o índice de reepitelização, o comportamento da microvasculatura, população de mastócitos e padrão de colagenização. Observou-se uma provável propriedade imunomodulatória da própolis vermelha sobre a reação inflamatória, traduzida em maior infiltração plasmocitária nos grupos G3 e G6, sugerindo amadurecimento precoce da resposta inflamatória. Os grupos experimentais mostraram tendência maior a uma melhor reepitelização, especialmente na primeira etapa do experimento, sobretudo no grupo tratado com própolis. Além disso, os vasos sanguíneos se mostraram menos abundantes na primeira fase do experimento e mais dilatados na

segunda fase no grupo controle, mas não houve diferença entre os grupos experimentais. Observaram-se ainda evidências de maior desgranulação mastocitária na primeira fase do experimento no grupo controle, mas não entre os grupos experimentais. Com relação à fibroplasia, na primeira fase do experimento, o grupo controle exibiu deposição de colágeno tipo III em detrimento da deposição de colágeno do tipo I (embora com aparência imatura) nos grupos experimentais. Na segunda fase, por sua vez, todos os grupos exibiram densa deposição de colágeno I, embora o padrão de deposição fosse menos intenso no grupo controle. Ressalta-se que, na fase inicial, a colagenização pareceu mais intensa e na fase final o colágeno depositado pareceu mais maduro e com disposição mais entrelaçada – assemelhando-se mais com a pele normal – nos grupos tratados com própolis. Conclui-se, pois, que a associação entre as membranas de colágeno e a própolis vermelha promoveu os melhores resultados no processo de cicatrização de segunda intenção em ratos.

Palavras-chave: Própolis vermelha, cicatrização e feridas.

HISTOMORPHOLOGICAL STUDY OF THE EFFECT OF COLLAGEN-BASED MEMBRANES CONTAINING RED PROPOLIS ON SECOND-DENTION WOUND HEALING PROCESS IN RATS.

André Luiz Santos Barreto

Propolis is a resinous balsamic substance of viscous consistence and variable color, produced by bees (*Apis mellifera L.*), whose therapeutic properties depend on botanic origin, geographic location and origin. Hydroalcoholic extracts of propolis have been employed in different situations such as antibacterial agents, anti-inflammatory and healing in oral and dermal wounds. In spite of conventional green propolis properties have been widely discussed in contemporary literature, studies about a characteristic regional variety of Sergipe state, the red propolis, are still extremely insufficient. Bovine reconstituted type-I collagen has been largely used as biomaterial, in health care, in a wide sort of clinical conditions, and it is possible to be dispensed in a variety of pharmaceutical forms, such as films (membranes) and sponges. Hence, the aim of this research consists in carrying out a histomorphological study of the effect of films (membranes) of collagen containing extracts of red propolis in murine model. Therefore, hydroalcoholic extracts of red propolis were incorporated to bioactive films, prepared with type I collagen extracted from bovine tendon and applied on standardized surgical wounds previously performed in the back of rats. The animals were distributed in six groups (n=5): G1 and G2 – animals with no treatment were sacrificed in 7 and 14days; G3 and G4 – animals treated with collagen membranes sacrificed in 7 and 14days; G5 and G6 – animals treated with collagen membrane containing red propolis sacrificed in 7 and 14days. The specimens removed were formalin-fixed, and paraffin-embedded and histological sections were stained in HE, toluidin blue and picrosius red. The variables analyzed in this study were the inflammatory pattern, epithelization index, microvascular behavior, mast cell population and collagenization pattern. It was observed a possible immunomodulatory property of red propolis over the inflammatory reaction, expressed as greater plasmacytic infiltration in G3 and G6, suggesting precocious maturity of the inflammatory response. The experimental groups showed tendency to better epithelization, particularly in the first phase of the experiment, mainly in the propolis- treated groups. Besides, blood vessels showed to be less conspicuous in the first phase and more enlarged in the second one in the control group, but there was no difference among the experimental groups. It was also observed evidence of more intense mast cell degranulation in the first step of the research in the control group, but not among the experimental ones.

Regarding the fibroplasia, at the seventh day the control group exhibited deposition of type-III collagen in opposition to type-I collagen (even though presenting an immature appearance) seen in the experimental groups. At the fourteenth day, on the other hand, all the groups exhibited dense deposition of type-I collagen, although the pattern of deposition had been less conspicuous in the control group. It shall be emphasized that collagenization in the propolis-treated groups seemed more intense in the initial phase, whereas it appeared to be more mature and with entwined arrange –resembling the normal dermal collagen - in the final phase. It was concluded that the association of collagen-based membranes and red propolis provided the best results in improving second-intention wound healing in rats.

Key-words: red propolis, wound healing, collagen membranes.

1. INTRODUÇÃO

A cicatrização de feridas consiste em uma série de eventos celulares, moleculares e bioquímicos que se comportam de forma harmoniosa a fim de garantir a regeneração do tecido lesado. O processo de cicatrização por segunda intenção, por sua vez, caracteriza-se por indução do reparo em feridas com perda maior de células e tecidos. O fenômeno fisiopatológico que diferencia a cicatrização primária da secundária refere-se ao processo de contração da ferida (MANDELBAUM, DI SANTIS e MANDELBAUM, 2003).

A reparação começa com uma reação inflamatória de intensidade variável, seguida por proliferação marcante de fibroblastos e células endoteliais. Este último fenômeno representa a formação de um tipo especializado de tecido denominado reação de granulação, que é o indicador principal da instalação do processo de cicatrização (KUMAR, ABBAS e FAUSTO, 2005).

A busca por elementos que atuem na dinâmica da reparação tecidual há muito vem sendo motivo de estudo e preocupação, principalmente no que se refere à promoção da bioestimulação celular, o que poderia resultar em aceleração no processo de cicatrização, sem causar efeitos danosos às células, tecidos ou órgãos.

O colágeno tipo I representa um importante constituinte protéico da pele humana, e parece ter um importante papel na dispersão e dissipação de forças mecânicas, posto que é abundante em tecidos onde forças extremas são transmitidas, como tendões e ossos, além da pele (VIEIRA, 1997). O potencial de interação da matriz de colágeno acelar com células circunjacentes, a ponto de induzir nestas últimas alterações morfo-estruturais, já foi demonstrado na literatura (CHEN *et al.*, 2000; ELLIOTT *et al.*, 2002). Desta forma, em virtude de suas propriedades bioativas, o colágeno, sob diversas formas, vem sendo utilizado como adjuvante no reparo de injúrias físico-químicas (BERNALES *et al.*, 2004).

Destaca-se que, além de apresentar propriedades físicas, químicas e estruturais bem elucidadas, essa glicoproteína tem não apenas se mostrado de fácil isolamento e purificação (HAO, LIN e SHEU, 1997), mas também pode ser dispensado em distintas formas, como filmes e esponjas (SRIVASTAVA *et al.*, 1990).

Ao longo da história, o homem apreendeu a utilizar os produtos naturais na Medicina. Dentre as várias formas de utilização, destacam-se as plantas brutas (como as ervas), além das tradicionais preparações galênicas (a exemplo dos extratos). Um dos muitos produtos naturais utilizados durante séculos pela humanidade tem sido a

própolis, uma substância resinosa balsâmica de consistência viscosa e cor variada, fabricada por abelhas *Apis mellifera* L., utilizada para esterilizar, vedar e impermeabilizar a colméia (MANARA *et al.*, 1999).

Várias propriedades terapêuticas da própolis vêm sendo discutidas na literatura, a exemplo de atividade antimicrobiana (BOSIO *et al.*, 2000) e um provável potencial antiinflamatório (SOSA *et al.*, 1997; SFORCIN, ORCI e BANKOVA, 2005), além de antioxidante e imunomodulatório (KOSALEC *et al.*, 2005).

A coloração e as propriedades terapêuticas da própolis dependem da sua composição química, origem botânica, localização geográfica e procedência (SANTOS *et al.*, 2003; COUTO, 1996). Assim, a própolis pode variar do marrom escuro passando a uma tonalidade esverdeada até o marrom avermelhado (ADELMANN, 2005).

Apesar das propriedades biológicas da própolis verde convencional, abundante no território brasileiro, estarem sendo amplamente discutidas na literatura contemporânea, (AHMED, 1996; MANARA *et al.*, 1999; MARCUCCI, 1995; MENEZES, 2005) estudos sobre a variedade regional característica do estado de Sergipe, a própolis vermelha, são ainda extremamente escassos.

Diante do exposto, constituiu proposição do presente trabalho analisar o efeito do tratamento com extrato hidroalcoólico de própolis vermelha incorporado a filme de colágeno I sobre processo de reparo cicatricial por segunda intenção. Tencionou-se, com esse objeto de estudo, obter informações primárias acerca do potencial cicatrizante dessa variedade da própolis associada a membranas de colágeno.

1.1 – OBJETIVOS

1.1.1 – Objetivo geral

- Avaliar o efeito de membranas de colágeno contendo própolis vermelha sobre o processo de reparo cicatricial por segunda intenção em ratos.

1.1.2 – Objetivos específicos

- Analisar o efeito imunomodulatório das membranas de colágeno associadas à própolis vermelha a 0,1% sobre o processo inflamatório durante o reparo.

- Avaliar o efeito das membranas de colágeno contendo própolis vermelha a 0,1% sobre: o índice de reepitelização, a degranulação de mastócitos e a microvasculatura.

- Analisar o efeito da associação de membranas de colágeno à própolis vermelha a 0,1% sobre o processo de síntese, deposição e arranjo arquitetural da matriz de colágeno durante o reparo cicatricial por segunda intenção.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1- CICATRIZAÇÃO

A cicatrização é um processo orgânico de restauração da lesão induzida por agressão local. Este tema tem sido incessantemente estudado e a procura de fármacos que acelerem o processo cicatricial normal tem sido objeto freqüente de pesquisa. (ARAÚJO *et al.*, 1998).

A situação mais favorável para uma cicatrização é quando a ferida está fechada, suturada e não infectada, conhecida como ferida incisional, em oposição à ferida excisional, na qual ocorre a remoção de um fragmento extenso de tecido. (BERENGUEL, 2006.)

A cicatrização por primeira intenção é uma ferida fechada não infectada, aos moldes de uma ferida cirúrgica incisional, em que há uma aproximação dos bordos da ferida e o processo de cicatrização evolui diretamente à produção de uma cicatriz. (BRASILEIRO FILHO, 2000).

A cicatrização por segunda intenção é uma ferida aberta não infectada, na qual é preenchida inicialmente por tecido de granulação que se contrai e torna-se uma cicatriz. (BRASILEIRO FILHO, 2000).

Na cicatrização após a lesão, são identificadas três fases consecutivas do processo de cicatrização, que ocorrem quase simultaneamente: fase exsudativa ou inflamatória; fase proliferativa ou fibroblástica; e fase cicatricial ou de contração (SINGER; CLARK, 1999).

A fase exsudativa ou inflamatória tem início logo após o trauma e é caracterizada pela vasoconstrição, que ocorre por um período de três a cinco segundos, inicialmente reflexa e posteriormente mantido por substâncias vasoativas (bradicinina e histamina), ocorrendo em seguida a vasodilatação. Como conseqüência ocorre a presença de exsudato inflamatório no local da ferida, composto de plasma, eritrócito e leucócitos. Esta fase também é caracterizada pela presença de dor, calor, rubor e tumor (CORSI, CORSI e PIRANA, 1995; BARROS e SOUZA, 2000).

As primeiras células de defesa a chegarem ao local da lesão são os neutrófilos que atuam no controle da infecção através da fagocitose, destruição de bactérias e lise de tecido desvitalizado, sendo que a deficiência de algumas dessas funções pode estar associada com o aumento da suscetibilidade à infecção. A atividade dos

neutrófilos é acentuada por anticorpos lançados na ferida devido às alterações vasculares. Gradualmente, os neutrófilos diminuem em número e são substituídos por outras células do sistema de defesa, uma das características da cronificação do processo (CONTRAN, KUMAR e COLLINS, 2000).

A infiltração pelos macrófagos, que continuam o processo de fagocitose iniciado pelos neutrófilos, é um componente importante da inflamação crônica. Os macrófagos produzem e liberam fatores, como as monocinas, que controlam a formação do tecido de granulação, influenciam a angiogênese, estimulam a proliferação de células mesenquimais e a migração e proliferação dos fibroblastos, produzem enzimas proteolíticas que digerem a fibrina e o colágeno desvitalizado e removem os neutrófilos dando lugar a proliferação celular (MANDELBAUM; DI SANTIS e MANDELBAUM, 2003).

Os macrófagos também podem ser importantes nas reações imunológicas por removerem excesso de antígeno e participarem da regulação da proliferação dos linfócitos (CONTRAN, KUMAR e COLLINS, 2000).

Analisadas tais considerações, a resposta celular também depende de mediadores bioquímicos. Assim, além da leucotaxina e prostaglandinas, há referência a um determinado fator linfático de permeabilidade, obtido experimentalmente a partir de nódulos linfáticos destruídos, por congelação ou irradiação. Esse fator linfático de permeabilidade mostrou propriedades quimiotáticas sobre os leucócitos, em cultura de tecidos; todavia, ele estaria intimamente ligado às reações inflamatórias crônicas e às de hipersensibilidade do tipo retardado. (WERNER e GROSE, 2003).

Existem outros tipos de células presentes no processo inflamatório crônico que são os linfócitos, plasmócitos e eosinófilos, dando início à resposta imune aos antígenos invasores. A duração e intensidade da resposta inflamatória são sinais importantes na avaliação da severidade, morbidade e possíveis fatores que venham interferir na cicatrização (CORSI, CORSI e PIRANA, 1995).

A fase proliferativa se caracteriza por intensa neoformação vículo-capilar e proliferação fibroblástica. A neovascularização se inicia nos primeiros dias após a injúria. As células endoteliais se multiplicam constituindo cordões sólidos que entremeiam os fibroblastos. Posteriormente, esses cordões se canalizam, resultando em tecido de granulação, com aspecto granuloso, avermelhado e pouco consistente. (KUMAR, ABBAS e FAUSTO, 2005). Os fibroblastos, por sua vez, se movem na ferida ao longo da matriz extracelular e, após ingressarem na mesma, podem assumir três fenótipos: migratório, produtor de colágeno ou contrátil (CONTRAN; KUMAR e COLLINS, 2000).

A matriz extracelular do tecido conjuntivo tem papel fundamental nesta fase do reparo. A matriz é um complexo de macromoléculas que, não só providencia suporte estrutural para os tecidos, mas também modula várias funções dos componentes celulares, tais como: proliferação, diferenciação, movimentação e junção celular (CONTRAN, KUMAR e COLLINS, 2000).

A etapa seguinte consiste na fase cicatricial, caracterizada por epitelização da superfície da ferida e contração cicatricial. A proliferação das células epiteliais ocorre até que haja justaposição dos vários botões epiteliais e formação de camadas subseqüentes. A delgada epiderme, formada inicialmente, é frágil em decorrência da ausência das interdigitações entre o epitélio e o conjuntivo subjacente (HUPP, 1996).

A contração cicatricial é um processo que produz uma diminuição da área lesada e, juntamente com a reepitelização, participa ativamente para o fechamento da ferida (POWELL *et al.*, 1999).

No tecido de granulação, os fibroblastos proliferam e adquirem maior quantidade de retículo endoplasmático rugoso e, surgem nos cortes histológicos na forma de células grandes e agrupadas. Alguns dos fibroblastos são ativos na síntese do colágeno. Outros fibroblastos grandes no tecido de granulação adquirem características de células musculares lisas, denominadas de miofibroblastos, que confere capacidade contrátil ao tecido de granulação, reduzindo a área cruenta da ferida nos processos de cicatrização. A contração central das bordas das feridas abertas tem sido atribuída a estes miofibroblastos, presentes no interior da matriz do colágeno, garantindo aumento da força tênsil da cicatriz (HUPP, 1996).

Segundo Powell *et al.* (1999), os miofibroblastos são células mesenquimais especializadas, com propriedades similares às das células mesenquimais lisas e dos fibroblastos. São expressas em condições experimentais ou patológicas como parte da resposta do hospedeiro à injúria, e consideradas responsáveis pela contração da ferida. Apesar da heterogeneidade de fenótipos, associada às diferentes funções que exercem nos tecidos, os miofibroblastos pertencem a uma única classe de células. Podem ser definidos morfológicamente ou imunologicamente através da expressão de proteínas do citoesqueleto, especialmente de filamentos de vimentina, desmina e alfa-actina, sendo as duas últimas auxiliares na diferenciação dessas células com as do músculo liso.

A presença de quatro fenótipos principais de miofibroblastos foi descrita em co-expressão com isoformas de actina. O primeiro expressa apenas a vimentina (V), o segundo expressa vimentina e desmina (VD), o terceiro compreende expressão de vimentina e alfa-actina (VA) e o quarto, as três, ou seja, vimentina, desmina e alfa-actina (VDA). (CONTRAN, KUMAR e COLLINS, 2000)

A presença de miofibroblastos em feridas excisionais tem sido relatada como preponderante no oitavo dia do processo de reparo. O uso do laser de dióxido de carbono parece estar associado a uma menor quantidade de miofibroblastos e comparação ao uso do bisturi convencional (FREITAS *et al.*, 2002).

2.2- COLÁGENO

O colágeno representa cerca de 30% da proteína existente no organismo de vertebrados e está presente em tecidos que possuem função mecânica (NIMNI *et al.*, 1987; FORTI, GOISSIS e PLEPIS, 2006). Juntamente com sais de cálcio é responsável pela estrutura rígida dos ossos. Em combinação com outra proteína (a elastina) formam estruturas mais flexíveis, as quais são essenciais, por exemplo, para a aorta e os pulmões. Também é encontrado nos dentes e em cartilagens. (FRIESS, 1998; VERAART *et al.*, 1998; LEE, SINGLA e LEE, 2001).

O colágeno tem sido usado para diversas aplicações no campo biomédico, o que pode ser atribuído à sua alta resistência à tensão, biodegradabilidade controlada, propriedades hemostáticas, não citotoxicidade, baixa antigenicidade e características não-inflamatórias (FRIESS, 1998).

Tanto o colágeno quanto os seus produtos de degradação, foram conhecidos como quimicamente atrativos por vários tipos de células. Seu papel na cicatrização de feridas é bem delineado. Estudos de culturas realizados *in vitro* demonstraram claramente que o colágeno, sendo um substrato natural para as células, é altamente essencial para mantê-las com sua morfologia e fenótipos normais, em cultura. A matriz de colágeno oferece uma estrutura de suporte biointerativa, a qual guia e estimula apropriada formação tecidual (LEE, SINGLA e LEE, 2001).

O colágeno é a proteína mais abundante do tecido conjuntivo, podendo ser encontrado na pele, ossos, tendões e dentes. Suas propriedades diferem de acordo com o tipo de organização das fibras que o constitui. Além de desempenhar importante papel na estrutura dos tecidos, o colágeno é capaz de orientar a formação de tecidos em desenvolvimento (WILLIAM, 1987), fato altamente favorável na sua utilização como biomaterial (SILVER e DOILLON, 1989).

O colágeno tipo I é encontrado predominante em animais de grande porte, especialmente na pele, tendões e ossos onde forças extremas são transmitidas (FRIESS, 1998). As demais moléculas de colágeno podem ser encontradas, por exemplo, em cartilagens e humor vítreo (tipo II), vasos sanguíneos e trato gastrointestinal (tipo III) e membrana basal (tipo IV) (VIEIRA, 1997).

O colágeno tipo I pode ser utilizado como biomaterial pela sua excelente biocompatibilidade, devido às suas características de baixa toxicidade e imunogenicidade (MEADE & SILVER, 1990; HAO, LIN e SHEU, 1997; LEE, SINGLA e LEE, 2001). Outra vantagem do colágeno como biomaterial é que este polímero possui estrutura, propriedades físicas, químicas e imunológicas bem elucidadas. Também pode ser rapidamente isolado e purificado em grandes quantidades (HAO, LIN e SHEU, 1997).

Este biomaterial pode ser processado em inúmeras formas tais como, tubos, folhas, esponjas, pós, soluções injetáveis e dispersões (SRIVASTAVA *et al.*, 1990). Nestas formas acima citadas podem formar sistemas de liberação de fármacos.

Alguns estudos têm se concentrado em promover a incorporação de compostos bioativos (fármacos sintéticos ou produtos naturais) em biomateriais implantáveis, a exemplo do colágeno I, especialmente em virtude das vantagens relacionadas à liberação controlada do produto diretamente no tecido danificado. Adicionalmente, o sistema de liberação controlada permite a manutenção de níveis constantes da droga no organismo, implicando numa eficiência maior na utilização do agente e aplicação diretamente no sítio de ação, produzindo altas concentrações localizadas e reduzindo ou evitando efeitos colaterais sistêmicos e menor frequência de administração do agente ativo, aumentando o conforto do paciente e eficácia do tratamento (LEE, SINGLA e LEE, 2001).

Diferentes biomateriais têm sido utilizados como suporte no reparo de tecidos, sendo cada tipo selecionado para o uso mais adequado, conforme suas características e propriedades, mas uma habilidade comum aos que são efetivamente incorporados (absorvidos e degradados) pelo tecido receptor é a da angiogênese (servir de suporte para o crescimento de novos vasos sanguíneos). Isso é necessário para que ocorra a nutrição das células que irão preencher o tecido-suporte, para que os produtos da degradação destas células sejam eliminados e para que as células de defesa tenham acesso ao local, evitando a contaminação por agentes infecciosos (BADYLAK *et al.*, 1999).

Os efeitos benéficos para a cicatrização de feridas pelo uso de biomateriais como géis, esponjas e filmes contendo o colágeno podem ser resumidos como se segue:

- o colágeno exógeno funciona como um substrato para a hemostasia e a quimiotaxia para elementos celulares envolvidos na cicatrização como os granulócitos, macrófagos e fibroblastos.

- os materiais à base de colágeno promovem a maturação da ferida por fornecerem um suporte para uma transição mais rápida à produção do colágeno maduro e seu alinhamento.

- biomateriais são resistentes à degradação e funcionam como suporte para a adesão, migração e proliferação celular (GIRARDI, 2005).

2.3- PRÓPOLIS

Ao longo da história, o homem apreendeu a utilizar os produtos naturais na Medicina. Dentre as várias formas de utilização, destacam-se as plantas brutas (como as ervas), além das tradicionais preparações galênicas (como os extratos). Um dos muitos produtos naturais utilizados durante séculos pela humanidade tem sido a própolis, a qual é administrada sob diversas formas (PEREIRA *et al.*, 2002).

A própolis foi usada por muitos anos, pela medicina popular, por suas propriedades cicatrizantes pelos egípcios, gregos, romanos, etc. de uma forma empírica. Nos dias de hoje a própolis é ainda um fármaco não oficial para as preparações farmacêuticas e sem limites de qualidade. São conhecidas na própolis diversas substâncias de estruturas químicas distintas, pertencentes às seguintes classes: alcoóis, aldeídos, ácidos alifáticos, ésteres alifáticos, aminoácidos, ácidos aromáticos, flavonóides, ésteres hidrocarboidratos, éter, ácidos graxos, cetonas, terpenóides, esteróides e açúcares (MANARA *et al.*, 1999).

A própolis é uma substância resinosa balsâmica de consistência viscosa e cor variada, fabricada por abelhas *Apis mellifera L.*, utilizada para esterilizar, vedar e impermeabilizar a colméia, além de ser um bom isolante térmico (MANARA *et al.*, 1999).

A coloração da própolis é dependente de sua procedência, pode variar do marrom escuro passando a uma tonalidade esverdeada até o marrom avermelhado, dependendo de seu tipo e idade. Possui um odor característico que pode variar de uma amostra para outra. O ponto de fusão é variável entre 60 – 70 °C sendo que pode atingir em alguns casos, até 100 °C (MARCUCCI, 1995). É uma substância rígida, mas quebradiça quando fria e que se torna dúctil e maleável quando aquecida. Sua remoção da pele humana é difícil, pois parece interagir fortemente com óleos e proteína da pele. A própolis é coletada por abelhas a partir de diversas partes das plantas como brotos, botões florais, casca e exsudatos resinosos. Durante a coleta as abelhas misturam a cera e a própolis coletada juntamente com a enzima 13 –

glicosidase presente em sua saliva, acarretando a hidrólise dos flavonóides glicosilados até suas respectivas agliconas (PARK *et al.*, 1998).

A resina contida na própolis é coletada na vegetação das cercanias da colméia. O espectro de vôo de uma abelha *A. mellifera* abrange um raio de cerca de 4-5 km em torno da colméia, de onde abelhas campeiras coletam pólen e néctar para alimentação, bem como resina para a própolis. Não são conhecidos os fatores que direcionam a preferência das abelhas coletoras de resina por uma determinada fonte vegetal, mas se sabe que elas são seletivas nesta coleta (TEIXEIRA *et al.*, 2005). Sugere-se que esteja relacionada com a atividade antimicrobiana da resina, uma vez que as abelhas utilizam a própolis como um anti-séptico, revestindo toda a parte interna da colméia (MARCUCCI, 1995).

Suas propriedades terapêuticas dependem da origem botânica, localização geográfica e procedência, porém sua estrutura microscópica não apresenta diferenças, mesmo sendo de diversas regiões ou diferentes épocas do ano (SANTOS *et al.*, 2003; COUTO, 1996).

A amplitude das atividades farmacológicas da própolis é maior em regiões tropicais do planeta e menor nas regiões temperadas, refletindo a diversidade vegetal destas regiões: nas regiões tropicais a diversidade vegetal é muito superior à diversidade observada nas regiões temperadas (BANKOVA, 2005).

As soluções anti-sépticas são largamente empregadas em feridas não contaminadas com o intuito de prevenir infecção. Vários estudos têm sido realizados neste sentido procurando encontrar uma substância que reduza os efeitos da contaminação e favoreça o processo cicatricial. (RYAN, 1993).

A própolis é rica em flavonóides e vem sendo utilizado para vários propósitos (BLONSKA *et al.*, 2004; AL-SHAHER *et al.*, 2004). Extratos etanólicos, hidroalcolólicos e aquosos da própolis têm sido utilizados em diferentes situações como agentes antimicrobianos (MARCUCCI *et al.*, 2001; PARK *et al.*, 1998; AHMED, 1996), como antiinflamatórios (SOSA *et al.*, 1997), como cicatrizante (GHISALBERTI, 1979), em ferimentos orais e da pele (ARVOUET-GRAND, 1993; PARK *et al.*, 1998). Além disso, também vem sendo utilizada pelas indústrias farmacêuticas e alimentícias na forma de alimentos funcionais (ACKERMANN, 1991). É encontrada em produtos farmacêuticos tais como: loção anti-acne, cremes faciais, pomadas, loções e soluções (PARK *et al.*, 1998).

As pesquisas científicas revelam seu amplo espectro de efeitos, incluindo propriedades antioxidantes, antibacterianas (conferida pela presença de flavonóides, ácidos aromáticos e ésteres em sua composição), ação bactericida (atribuída à presença dos ácidos ferúlico e cafeico), antifúngicas, antivirais (em função da ação de

flavonóides e derivados de ácidos aromáticos), antiinflamatórias (atribuído à presença do ácido cafeico, a quercetina, a narigenina e o éster fenetílico do ácido cafeico (CAPE), antioxidante, antitumoral e imuno-modulatórias (KOSALEC *et al.*, 2005).

Como agente antiinflamatório, a própolis demonstra inibir a síntese das prostaglandinas e de leucotrienos pelos macrófagos, ativar a glândula timo, auxiliar o sistema imune pela promoção da atividade fagocitária, estimular a imunidade celular e aumentar os efeitos cicatrizantes nos tecidos epiteliais (RUSSO, LONGO e VANELLA, 2002; ORSOLIC e BASIC, 2003).

A atividade antiinflamatória da própolis já está bastante reconhecida, principalmente contra doenças do sistema muscular-articular e outros tipos de inflamações, infecções, reumatismos e torções (MARCUCCI, 1995). Apesar de o mecanismo exato de ação e os compostos principais responsáveis ainda não terem sido estabelecidos, as pesquisas têm se focado no metabolismo do ácido araquidônico, já que as prostaglandinas têm papel fundamental no processo inflamatório (ROSSI *et al.*, 2006). Os metabólitos do ácido araquidônico exercem uma variedade de atividades biológicas. Vários estudos têm comprovado que os metabólitos da ciclooxigenase modulam a proliferação celular, crescimento de tumores e respostas imunes, enquanto que os metabólitos da lipooxigenase podem influenciar em várias respostas biológicas incluindo quimiotaxia, secreção de hormônios, transporte de íons, estímulo de adesão de células tumorais, desenvolvimento de tumores e regulação do potencial metastásico de células tumorais. Deste modo vários estudos estabelecem os metabólitos do ácido araquidônico como moduladores de patogênese de várias doenças imunológicas e inflamatórias (RUSSO *et al.*, 2002).

ROSSI *et al.* (2006) relataram que os extratos etanólicos de própolis inibem também a atividade da ciclooxigenase em pulmão de ratos de forma dose-dependente. Entre os compostos isolados testados apenas o CAPE e a galangina tiveram efeito, sendo o primeiro mais eficaz que o segundo. BORELLI *et al.* (2002) observaram que os extratos etanólicos de própolis com CAPE e o CAPE isolado inibem de forma dose-dependente o edema de patas em ratos, o volume de exsudato, a migração dos leucócitos e a artrite induzida por carragenina. Além disso, os extratos de própolis sem CAPE e a galangina não demonstraram efeitos antiinflamatórios, sugerindo que este efeito da própolis se deve ao seu conteúdo de CAPE. Uma explicação para a maior atividade do CAPE isolado do que a própolis que o contém é que vários flavonóides que em altas concentrações são capazes de inibir a síntese de prostaglandinas, também são capazes em baixas concentrações de estimular a enzima para a produção de prostaglandina.

As propriedades de regeneração tecidual como cicatrização de úlceras e feridas podem estar relacionadas com a atividade antioxidante da própolis. Esta atividade tem sido atribuída aos flavonóides existentes no extrato de própolis. O processo de regeneração é dificultado na presença de radicais livres. A remoção dos mesmos pelos flavonóides da própolis permitiria que o órgão ou tecido doente pudesse se regenerar normalmente. Sugere-se que as moléculas de flavonóides podem remover estes radicais e, portanto, contribuir com o processo de regeneração (MENEZES, 2005).

SUTTA *et al.* (1974) utilizaram solução alcoólica de própolis no tratamento de feridas em animais domésticos, tanto em casos clínicos como experimentais. Esses pesquisadores observaram seu bom efeito epitelizante, considerando-a adequada para o tratamento de feridas após a eliminação da infecção.

DAMYANLIEV *et al.* (1982) aplicaram solução tópica de própolis (20 e 30%) em pacientes com feridas supuradas. Foi observado que a cicatrização ocorria dentro de um período de tempo menor do que as tratadas com pomada de Vishnevsky e 20% de clorato de sódio.

SOENGIL *et al.* (2000) avaliaram os efeitos da vaselina (grupo A), sulfadiazina de prata (grupo B) e própolis 5 ou 10% (grupos C e D), em feridas de espessura total em coelhos. As taxas de fibras colágenas e epitelização dos grupos C e D excederam àquelas dos grupos A e B.

MAGRO FILHO e PERRI DE CARVALHO (1994) realizaram estudos com 45 ratos para avaliar histologicamente os efeitos de solução hidroalcoólica de própolis a 10% e solução hidroalcoólica pura sob alvéolos de ratos e feridas cirúrgicas, trocadas diariamente até o período de sacrifício dos animais. Concluíram que a solução hidroalcoólica de própolis acelerou a epitelização de feridas de pele, mas não acelerou a cicatrização após a extração dentária.

Portanto, parece está havendo um crescente empenho na produção e exploração da própolis, sendo que esse interesse global de pesquisas em própolis tem duas justificativas: a primeira devido a suas características de panacéia (várias atividades biológicas). De certa maneira essas características também atrapalham sua aceitação, já que os médicos e outros profissionais tendem a desconfiar da sua eficácia devido a lhe serem atribuída dezenas de atividades biológicas simultaneamente. A segunda é devida ao seu alto valor agregado, com o que um frasco do extrato alcoólico é vendido no Brasil por cerca de 5 a 10 reais, mas chegando a custar 150 dólares em Tóquio (NOTHENBERG, 1997; PEREIRA *et al.*, 2002). Este alto valor agregado em Tóquio pode justificar em parte o interesse dos japoneses na própolis, principalmente a brasileira (sendo hoje a terceira maior

produção mundial, perdendo apenas para a Rússia e a China). Embora produza de 10 a 15% da produção mundial, o Brasil atende a cerca de 80% da demanda japonesa. Dados da Federação de Apicultores de Minas Gerais revelam que a própolis produzida no estado é considerada a melhor do mundo no mercado japonês, onde o quilograma do produto saltou de US\$ 5 para US\$ 200 nos últimos anos (PEREIRA *et al.*, 2002).

O desenvolvimento de formas farmacêuticas e trabalhos que usam como princípio ativo a própolis, principalmente o própolis verde, já são bem conhecidos e divulgados, entretanto nada ainda foi publicado sobre esta nova variedade de própolis vermelha encontrada no litoral sergipano.

REFERÊNCIAS

ACKERMANN, T. Fast chromatography study of propolis crude. *Food Chemistry*, 42(2): 135-138, 1991.

ADELMANN, J. Própolis: Variabilidade composicional, correlação com a flora e bioatividade antimicrobiana/antioxidante. Tese de Mestrado. Universidade do Paraná, Paraná, 2005

AHMED, F. H. Antimicrobial activity of bee glue (propolis) extracts. *Egypt J. Microbiol*, 31(3) : 423-435, 1996.

AL-SHAHER, A.; WALLACE, J.; AGARWAL, S.; BRETZ, W.; BAUGH, D. Effect of propolis on human fibroblasts from pulp and periodontal ligament. *Journal of Endodontics*, 30(5) : 359-361, 2004.

ARAÚJO, C.F.R.; SOUZA, F.Z.A.; GRECA, F.H.; GUERREIRO, M.H.C.P.M.; LEITE, A. L., MANSUR, A.E.C.; KANTOR, D.C.; NASSIF, A.E. Efeito do agarol e do trigliceril sobre a cicatrização da pele. Estudo experimental em ratos. *Acta Cir. Bras.*, 13(4): 232-237, 1998.

ARVOUET-GRAND, A. Propolis Extract. II. Wound healing in the rat and rabbit. *J Pharm Belg*, 48(3) : 171-178, 1993.

BADYLAK, S.; LIANG, A.; RECORD, R.; TULLIUS, R.; HODDE, J. Endothelial cell adherence to small intestinal submucosa: an acellular bioscaffold. *Biomaterials*. 20(21), 1999.

BANKOVA, V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *Journal of Ethnopharmacology*, 100(1/2) : 114-117, 2005.

BARROS, J.J.; SOUZA, L.C.M. Traumatismo Buco-Maxilo-Facial. 2 ed. São Paulo: Roca, 2000.

BERENGUEL, I.A. **Implantes das esponjas hemostáticas Gelfoam e Hemospon em alvéolos dentais em ratos após exodontia. Estudo histológico e histométrico comparativo.** Tese de Mestrado, UNIMAR, Marília, SP, Brasil, 2006.

BERNALES, D.M.; CARIDE, F.; LEWIS, A.; MARTIN, L. Membranas de colágeno polimerizado: consideraciones sobre su uso en técnicas de regeneración tissular y ósea guiadas. *Rev Cubana Invest Biomed.* 23(2) : 65-74, 2004.

BLONSKA, M.; BRONILKOWSKA, J.; PIETSZ, G.; CZUBA, Z.P.; SCHELLER, S. KROL, W. Effects of ethanol extract of propolis (EPP) and flavonoids on inducible gene expression in J774S.1 macrophages. *Journal of Ethnopharmacology*, 91(1) : 25-30, 2004.

BORELI, F.; MAFIA, P.; PINTO, L.; IANARO, A.; RUSSO, A.; CAPASO, S.; LALENT, A.; Phytochemical compounds involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract. *Fitoterapia*, 73(1): 53-63, 2002.

BOSIO, K.; AVANZINI, C.; D'AVOLIO, A.; OZIMO, O.; SAVOIA, D. In vitro activity of propolis against *Streptococcus pyogenes*. *Lett Appl Microbiol*, 31 : 174 – 177, 2000.

BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo Patologia.** 6 ed. Rio de Janeiro, 2000.

CHEN, C. S.; OSTUNI, E.; WHITESIDES, G. M.; INGBER, D. E. Using self-assembled monolayers to pattern ECM proteins and cells on substrates *Methods Mol. Biol.* 139: 209-219, 2000.

CONTRAN, R.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Robbins Patologia Estrutural e Funcional.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000

CORSI, R.; CORSI, P.; PIRANA, S. Fatores que prejudicam a cicatrização das feridas: revisão da literatura. *Revista Brasileira de Cirurgia*, 85(2) : 47-53, 1995.

COUTO, R.H.N. Apicultura: Manejo e produtos. *Funep.* 1(1) : 89-91, 1996.

DAMYANLIEV, R.; HEKIMOV, K.; SAVOVA, E.; AGOPIAN, R. The treatment of suppurative surgical wounds with propolis. *Folia Medica*, 24(2) : 24-27, 1982.

ELLIOT, S.J.; ZHENG, F.; FORNONI, A.; GUAN, Y.; BREYER, M.D.; STRIKER, L.J., STRIKER GE. Upregulation of type I collagen by TGF-beta in mesangial cells is blocked by PPAR gamma activation., *Am J Physiol Renal Physiol*, 4 : 639-648, 2002.

FORTI, F.L.; GOISSIS, G.; PLEPIS, A.M. Modifications on collagen structures promoted by 1,4-dioxane improve thermal and biological properties of bovine pericardium as a biomaterial. *J. Biomater Appl*, 20(3) : 267-285, 2006.

FREITAS, A.C.; PINHEIRO, A.L.B.; OLIVEIRA, G.M.; MARIA, L. Assessment of the behavior of myofibroblasts on scalpel and CO2 laser wounds: An immunohistochemical study in rats. *J. Clin. Laser Med. & Surg.* 20(4) : 221-115, 2002.

FRIESS, W. Collagen - biomaterial for drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 45 : 113-136, 1998.

GHISALBERTI, E.L. Própolis: a review. *Bee World*, 60 : 59-84, 1979.

GIRARDI, R.C.G. **Comportamento de matrizes de colágeno utilizadas no tratamento de feridas planas induzidas em pele de rato.** Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo - Universidade de São Carlos, São Paulo, Brasil, 2005.

HAO, H-O.; LIN, L-H.; SHEU, M-T. Characterization of collagen isolation and application of collagen gel as drug carrier. *J. Contr. Rel*, 44(2/3) : 103-112, 1997.

HUPP, J.R. Reparação de feridas. In : PETERSON et al. **Cirurgia oral e maxilo-facial**. 2ª ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan. Cap.4, 54-62., 1996.

KOSALEC, I.; PEPELJNJAK, S.; BAKMAZ. M.; VLADIMIR-KNEŽEVIĆ, S. Flavonoid analysis and antimicrobial activity of commercially available propolis products, *Acta Pharm.*, 55 : 423–430, 2005.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N. Robbins e Cotran Patologia – Bases Patológicas das Doenças. *Elservier.*, 2005.

LEE, C.H.; SINGLA, A.; LEE, Y. Biomedical applications of collagen. *Int. J. Pharm.* 221 : 1-22, 2001.

MAGRO FILHO, O.; PERRI DE CARVALHO, A.C. Topical effects of propolis in the repair of sulcoplasties by the modified Kazanjian technic. *J. Nihon. Univ. Sch. Dent.*, 36(32) : 102-111, 1994.

MANARA, L.R.B.; GROMATZKY, A.; CONDE, M.C.; BRETZ, W.A. Utilização da própolis em Odontologia, *F.B.O.*, 7(3/4) : 15-20, 1999.

MANDELBAUM, S.H.; DI SANTIS, É.P.; MANDELBAUM, M.H.S. Cicatrização, conceitos atuais e recursos auxiliares – Parte *An Brás Dermatol*, 78(4) : 393-410, 2003.

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

MEADE, K.R.; SILVER, F.H. Immunogenicity of collagenous implants. *Biomat.*, v.11, p.176-180, 1990. ACKERMANN, T. Fast chromatography study of propolis crude. *Food Chemistry*, 42(2) : 135-138, 1990.

MENEZES, H. Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. *Arq. Inst. Biol.*, 72(3) : 405-411, 2005.

NIMNI, M.E.; CHEUNG, D.; STRATES, B.; KODAMA, M.; SHEIKH, K. Chemically modified collagen: A natural biomaterial for tissue replacement. *J Biomed Mater Res*, 21 : 741-771, 1987.

NOTHENBERG, M. *Própolis enfrenta bem o desafio das pesquisas. Química e Derivados*, 348 : 24-28, 1997.

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

PARK, Y.K.; IKEGAKI, M.; ABREU, J.A.S.; ALCICIE, N.M.F. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 18(3), 1998.

PEREIRA, A.N.; EDUARDO, C.D.E.; MATSON, E.; MARQUES, M.M. Effect of low-power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblasts. *Laseres Surg. Med.* 31 : 263-267, 2002.

POWELL, D.W.; MIFFLIN, R. C.; VALENTICH, J. D., CROWE, S. E.; SAADA J. I.; WEST, A.B. Myofibroblasts I. Paracrine cells important in health and disease. *Am. J. Physiol.*, 277 : 1-19, 1999.

ROSSI, M.; NEGRI, E.; TALAMINI, R.; BOSETTI, C.; PARPINEL, M.; GNAGNARELLA, P.; FRANCESCHI, S.; DEL MASO, L.; MONTELLA, M.; GIACOSA, A.; LA VECCHIA, C. *Flavonoids and colorectal câncer in Italy. Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 15: 1555-1558, 2006.

RUSSO, A. ; LONGO, R ; VANELLA, A. The role of the phenetyl ester of caffeic acid (CAPE) in the inhibition of rat lung cyclooxygenase activity by propolis. *Fitoterapia*, 73 : 530-537, 2002.

RYAN, T. J. Wound healing in the developing world. *Dermatol. Clin.*, 11(4) : 791-800, 1993.

SANTOS, F.A.; BASTOS, E.M.A.F.; MAIA, A.B.R.A.; UZEDA, M.; CARVALHO, M.A.R.; FARIAS, L.M.; MOREIRA, E.S.A. Brazilian própolis: physicochemical properties, plant origin and antibacterial activity on periodontopathogens. *Phytotherapy research: PTR*, 17(3) : 285-289, 2003.

SFORCIN, J.M.; ORSI, R.O.; BANKOVA, V. Effects of propolis from Brazil and Bulgarian on Bactericidal Activity of Macrophages Against *Salmonella Typhimurium*. *Microbiol. Inmunolo. Bunkajo*, 5 (2):359-68, 2005.

SINGER, A.J.; CLARK, R.A.N. Cutaneous Wound Healing. *Engl J Med.*, 10 : 738-46, 1999.

SILVER, F.; DOILLON, C. Biocompatibility, interactions and implantable materials. New York: VCR., 1989

SOENGIL, J.; SEONGSOO, K.; SEONGKOO, C.; SEOKHWA, C. Effect of propolis on healing of full-thickness skin wound in rabbits. *Korean Journal of Veterinary Clinical Medicine*, 17(1) : 62-73, 2000.

SOSA, S.; B ARICEVIC, D.; CINCO, M.; PADOVAN, D.; TUBARO, A.; DELLA, L.R. Preliminary investigation on the anti-inflammatory and anti- microbial activities of propolis. *Pharmaceutical ana Pharmacological Letters*, 7 : 168-171, 1997.

SRIVASTAVA, S.; GORHAM, S.D.; FRENCH, D.A.; SHIVAS, A.A.; COURTNEY, J.M. In vivo evaluation and comparison of collagen, acetylated collagen and collagen/glycosaminoglycan composite films and sponges as candidate biomaterials. *Biomaterials*. 11: 155-161, 1990.

SUTTA, J.; HANKO, J.; JANDA, J.; TKAC, J. Experimental and clinical experiences in treatment of wounds in domestic animals by local application of an alcoholic solution of própolis. *Folia Veterinaria*, 18: 143-147, 1974.

TEIXEIRA, E.W.; NEGRI, G.; MEIRA, R.M.S.A.; MESSAGE, D.; SALATINO, A. Plant origino of Green propolis: bee behavior, plant anatomy and chemistry. *eCAM*, 2: 85-92, 2005.

VIEIRA, D. C. **Estudos da liberação da rolitetraciclina suportada em gel injetável de colágeno aniônico ransana**. Dissertação de Mestrado. IFQSC Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil, 1997.

VERAART, J.R.; KOK, S.J.; KOPPELE, J.M.; GOOIJER, C.; LINGEMAN, H.; VELTHORST, N.H.; BRINKMAN, U.A.TH. Capillary electrophoresis of the collagen crosslinking hp and lp utilizing absorbance, wavelength-resolved laser-induced fluorecence and conventional fluorecence detection. *Biomed. Chromatography*, 12:226-231, 1998.

WERNER, S.; GROSE, R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol. Rev.* 83: 835-870, 2003.

WILLIAM, D.F. Definition in biomaterials. New York: Elsevier, 1987.

Capítulo II
Avaliação do processo cicatricial por segunda
intenção em ratos tratados com membranas de
colágeno contendo própolis vermelha.

Avaliação do processo cicatricial por segunda intenção em ratos tratados com membranas de colágeno contendo própolis vermelha.

Evaluation of second-intention wound healing I rats treated with collagen-based membranes containing red propolis.

André Luiz Santos Barreto¹, Jônatas Almeida Pires², Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior^{3, 4}, Juliana Cordeiro Cardoso^{3,5}.

Resumo

Numerosos estudos vêm sendo realizados no sentido de utilizar produtos de ocorrência natural para melhorar a cicatrização de feridas cutâneas, particularmente membranas de colágeno bovino tipo I. Estudos têm indicado que a variedade vermelha da própolis brasileira parece exibir propriedades pró-cicatrizantes, mas não foram encontrados relatos de ensaios em modelo animal. Assim, o presente trabalho se propôs a avaliar o efeito de membranas de colágeno contendo própolis vermelha sobre a dinâmica do processo cicatricial. Para tanto, foram preparadas membranas de colágeno I extraído de tendão bovino (10-15µm de espessura) contendo extrato hidroalcoólico de própolis vermelha a 0,1%. Posteriormente, foram realizadas feridas de 1cm² no dorso de 30 ratos *Wistar*, que foram distribuídos em seis grupos (n=5): **G1 e G4**– animais sem tratamento sacrificados em 7 e 14 dias; **G2 e G5**– animais tratados com membrana de colágeno sacrificados em 7 e 14 dias; **G3 e G6**– animais tratados com membrana de colágeno contendo própolis vermelha sacrificados em 7 e 14 dias. Os espécimes removidos foram fixados, processados e emblocados em parafina e secções histológicas foram coradas em HE. Foram analisadas a reação inflamatória, índice de reepitelização médio e comportamento da microvasculatura. Aos 07 dias, a inflamação era intensa em todos os grupos, mas era predominantemente neutrofílica em G1, linfocitária em G2 e linfoplasmocitária em G3. Aos 14 dias, a inflamação sofreu redução substancial, especialmente em G5 e G6, sendo que, neste último, a infiltração foi predominantemente plasmocitária em oposição ao padrão linfocitário visto nos demais, sugerindo uma provável atividade imunomodulatória da própolis vermelha. Não houve diferença estatística no grau de reepitelização entre os grupos em ambos os tempos, mas os grupos experimentais, especialmente aquele tratado com própolis, mostraram certa tendência a apresentar os melhores índices. O número médio de vasos foi estatisticamente maior em G1, mas não houve diferença entre G2 e G3, nem entre os grupos sacrificados aos 14 dias (G4, G5 e G6). O perímetro vascular médio, por sua vez, foi estatisticamente maior em G4 que em G5 e G6, mas não houve diferença entre estes últimos e entre os grupos sacrificados aos 07 dias. Estes dados sugerem que a microvasculatura é influenciada pelo uso de membranas de colágeno, independente de conter ou não própolis vermelha. Concluiu-se que a utilização de membranas de colágeno tipo-I contendo extrato hidroalcoólico de própolis vermelha a 0,1% propiciou melhorias importantes no processo de reparo cicatricial por segunda intenção.

Palavras-chave: cicatrização, membranas de colágeno, própolis vermelha.

⁽¹⁾ Mestrando em Saúde e Ambiente. Universidade Tiradentes, Aracaju, SE.

⁽²⁾ Bolsista de Iniciação Científica (PIBIC/CNPq). Curso de Odontologia, Universidade Tiradentes, Aracaju, SE.

⁽³⁾ Professor do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Ambiente, Universidade Tiradentes, Aracaju, SE.

⁽⁴⁾ Laboratório de Morfologia e Biologia Estrutural. Instituto de Tecnologia e Pesquisa, Aracaju, SE.

⁽⁵⁾ Laboratório de Produtos Naturais e Sintéticos. Instituto de Tecnologia e Pesquisa, Aracaju, SE.

Abstract

Several studies have been performed in order to apply natural products in cutaneous wound to improve the healing process, particularly bovine collagen-based membranes. Other studies have pointed out at a probable cicatrizing property exhibited by brazilian red propolis, but any biological assay carried out in animal models has been reported so far. Therefore, this research aimed at evaluating the effect of collagen-based membranes containing red propolis on the dynamics of wound healing. Thus, Type I collagen-based membranes extracted from bovine tendon were prepared (10-15 μ m of thickness) containing hydroalcoholic extract of 0,1% red propolis. Afterwards, wounds of 1cm² were done in the dorsum of 30 *Wistar* rats, that were distributed in six groups (n=5): G1 and G2 – animals with no treatment were sacrificed in 7 and 14days; G3 and G4 – animals treated with collagen membranes sacrificed in 7 and 14days; G5 and G6 – animals treated with collagen membrane containing red propolis sacrificed in 7 and 14days. The specimens removed were formalin-fixed, and paraffin-embedded and histological sections were stained in HE. It was analyzed the inflammatory reaction, epithelization index and microvascular behavior. At the 7th day, inflammation was predominantly neutrophilic in G1, lymphocytic in G2 and lymphoplasmacytic in G3, although it has shown to be intense in all groups. At the 14th day, inflammation was substantially reduced, particularly in G5 and G6; besides the latter presented plasmacytic infiltration in opposition to lymphocytic infiltration exhibited by the other two groups. These data suggested a possible immunomodulatory role to red propolis. No statistically significant difference was verified in the epithelization index in both times, but the experimental groups, mainly those ones treated with red propolis, presented a certain tendency to show the best indexes. Vascular density was significantly higher in G1, but there was no difference between G2 and G3, nor among G4, G5 and G6. Oppositely, vascular perimeter was statistically higher in G4 than in G5 and G6, but no difference was seen neither between those two latter nor among the groups sacrificed at the 7th day. These data suggested that the microvascular content is influenced by the use of collagen-based membranes, independently of containing red propolis or not, It was concluded that the use of type I collagen-based membranes containing hydroalcoholic extracts of 0.1% red propolis provided some improvements of second-intention wound healing in rats.

Keywords: wound healing, collagen membranes, red propolis

Introdução

A cicatrização é um processo orgânico de restauração da lesão induzida por agressão local. Este tema tem sido incessantemente estudado e a procura de fármacos que acelerem o processo cicatricial normal tem sido objeto freqüente de pesquisa. (ARAÚJO *et al.*, 1998).

Esse processo pode se resolver basicamente através de duas formas distintas: *cicatrização por primeira intenção* que se caracteriza inicialmente com uma ferida fechada não infectada, em que há uma aproximação dos bordos da ferida e o processo de cicatrização evolui diretamente à produção de uma cicatriz, ou através da *cicatrização por segunda intenção* na qual existe uma ferida aberta não infectada, preenchida inicialmente por tecido de granulação, que se contrai e torna-se uma cicatriz. (BRASILEIRO FILHO, 2000).

Todo o processo pode ser dividido em fases distintas, caracterizadas pela população celular predominante e conserva uma seqüência de eventos que se sobrepõem no tempo e incluem inflamação, proliferação e remodelação tecidual. (CLARK, 1996).

Inicialmente, após a lesão tecidual, há uma vasoconstricção por 05 a 10 minutos, seguido por uma vasodilatação, com extravasamento de plasma, eritrócitos e leucócitos para este local que se traduz clinicamente por calor, rubor, tumor e dor. A seguir haverá uma resposta celular com predomínio de neutrófilos e monócitos, que se transformam em macrófagos. Dessa forma, após o trauma são liberados mediadores celulares que estimulam a elaboração de substâncias que desenvolvem o processo inflamatório (histamina, serotonina, bradicinina, entre outros) (MANDELAUBAN *et al.*, 2003).

Nas etapas posteriores haverá o reparo do tecido conjuntivo com a formação de tecido de granulação e do epitélio lesado, através do aprisionamento dos fibroblastos na rede de fibrina recém-formada que se multiplicam e passam a produzir fibras colágenas, promovendo uma intensa proliferação vascular local. Esse tecido formado por fibras colágenas, fibroblastos e vasos sangüíneos é denominado tecido de granulação (DIEGELMAN, EVANS, 2004).

Na literatura diversos trabalhos têm mostrado uma grande diversidade de substâncias usadas para melhorar o processo de cicatrização, como mitomicina C tópica (CAMARGO *et al.*, 2006), calcitonina sintética de salmão (EULÁLIO *et al.*, 2007), entre outros. Porém, as membranas de colágeno têm sido um dos materiais mais utilizados para reparar danos a traumas químicos e mecânicos devido a sua

biocompatibilidade e sua atividade pró-cicatrizante (YAMATOIGI *et al.*, 2005). Além disso, foi demonstrado que matrizes de colágeno estimulam a proliferação de miofibroblastos sendo este um dos fatores primordiais para o reparo tecidual (HELARY *et al.*, 2005).

Alguns estudos têm se concentrado em promover a incorporação de compostos bioativos (fármacos sintéticos ou produtos naturais) em biomateriais implantáveis, a exemplo do colágeno I, especialmente em virtude das vantagens relacionadas à liberação controlada do produto diretamente no tecido danificado (LEE, SINGLA e LEE, 2001).

Adicionalmente, produtos naturais fitoterápicos têm sido empregados como elementos adjuvantes na cicatrização de feridas (SEMENOFF SEGUNDO *et al.*, 2007). A própolis é uma substância resinosa balsâmica de consistência viscosa e cor variada, fabricada por abelhas *Apis mellifera L.*, utilizada para esterilizar, vedar e impermeabilizar a colméia, além de ser um bom isolante térmico (MANARA *et al.*, 1999).

Como agente antiinflamatório, a própolis demonstra inibir a síntese das prostaglandinas e de leucotrienos pelos macrófagos, ativar a glândula timo, auxiliar o sistema imune pela promoção da atividade fagocitária, estimular a imunidade celular e aumentar os efeitos cicatrizantes nos tecidos epiteliais (RUSSO, LONGO e VANELLA, 2002; ORSOLIC e BASIC, 2003).

As propriedades de regeneração tecidual como cicatrização de úlceras e feridas podem estar relacionadas com a atividade antioxidante da própolis. Esta atividade tem sido atribuída aos flavonóides existentes no extrato de própolis. O processo de regeneração é dificultado na presença de radicais livres. A remoção dos mesmos pelos flavonóides da própolis permitiria que o órgão ou tecido doente pudesse se regenerar normalmente. Sugere-se que as moléculas de flavonóides podem remover estes radicais e, portanto, contribuir com o processo de regeneração (MENEZES, 2005).

O desenvolvimento de formas farmacêuticas e trabalhos que usam como princípio ativo a própolis, principalmente o própolis verde, já são bem conhecidos e divulgados, entretanto nada ainda foi publicado sobre esta nova variedade de própolis vermelha encontrada no litoral sergipano.

Considerando as propriedades cicatrizantes observadas na literatura relativas à própolis, constitui proposição desta pesquisa analisar histomorfologicamente o efeito de filmes bioativos de colágeno contendo própolis vermelha sobre o processo de reparo cicatricial por segunda intenção em ratos.

Material e Métodos

Obtenção dos extratos de própolis vermelha

A obtenção dos extratos de própolis foi realizada conforme a metodologia aplicada por PARK *et al.* (1998), modificada por CARDOSO (2007). Foi usado 1g da amostra de própolis, passando por um processo de trituração e homogeneização e em seguida foram adicionados 100 mL de solução hidroalcolica 70%. A extração foi efetuada à temperatura ambiente por 24 horas. Após a extração, a amostra foi filtrada e o solvente rotaevaporado. O pó obtido foi armazenado em tubo de ensaio estéril com rosca e mantido em refrigerador.

Confecção das membranas

O colágeno tipo I foi obtido de tendão bovino através de tratamento com NaCl, ácido acético 0,5 mol/L e pepsina, segundo método descrito por CARDOSO (2005).

O extrato seco de própolis foi solubilizado em propilenoglicol 400 (PEG400), o qual serviu como co-solvente, uma vez que a própolis não dissolve em água, e como plastificante. Foi preparada uma solução de PEG400 com concentração de própolis igual a 0,5%.

Para a confecção das membranas utilizou-se uma dispersão aquosa a 1% de polímero (colágeno). A esta dispersão foi adicionada 0,2% de plastificante contendo a própolis, o que corresponde a 20% de plastificante em relação à massa seca do polímero e 0,1% de própolis na formulação final. Membranas contendo apenas o polímero e o plastificante também foram preparadas.

As membranas foram obtidas através de “Casting process” que consiste em verter a dispersão aquosa do polímero em suportes de polietileno. Estes suportes foram colocados em capela de exaustão e o solvente foi evaporado. Após esta etapa, os filmes foram retirados do suporte, cortados na dimensão de 2x2 cm. A esterilização foi feita utilizando radiação Ultravioleta (raios UV), por um período de 20 minutos.

Procedimentos cirúrgicos e formação de grupos

Para o procedimento cirúrgico foram utilizados um total de 30 ratos machos Wistar (300±50g) mantidos em gaiolas com cama de maravalha, trocadas diariamente, mantidos à temperatura controlada de 22°C, em regime de luz com ciclo claro-escuro de 12h, recebendo água *ad libitum* e dieta padrão Labina® (Purina, São Paulo, Brasil). A confecção das feridas foi realizada sob anestesia geral, com injeção intraperitoneal

de Thiopentax a 2,5%. O dorso dos animais foi tricotomizado e a antissepsia foi efetuada com iodopovidona tópico a 1%. Foram então realizadas feridas cirúrgicas padronizadas com área de 1cm². A profundidade foi determinada através da penetração da parte ativa da lâmina do bisturi em torno de 5,0mm. Não foi realizada sutura das feridas. Os animais foram então subdivididos nos seguintes grupos (n=5): G1 – animais sem tratamento sacrificados ao sétimo dia; G2 – animais tratados com membrana de colágeno sacrificados ao sétimo dia; G3 – animais tratados com membrana de colágeno contendo própolis vermelha sacrificados ao sétimo dia; G4 – animais sem tratamento sacrificados ao décimo quarto dia; G5 – animais tratados com membrana de colágeno sacrificados ao décimo quarto dia; G6 – animais tratados com membrana de colágeno contendo própolis vermelha sacrificados ao décimo quarto dia. Para o sacrifício, os animais foram submetidos à nova administração de anestésico em quantidade três vezes maior àquela utilizada para anestesia; posteriormente, foi realizada a remoção dos espécimes equivalentes a área cicatricial.

Ressalta-se que, antes da realização dos procedimentos cirúrgicos, o projeto de pesquisa foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da UNIT-SE.

Procedimentos histológicos

Decorrido o período de 24 horas para a fixação, as peças foram seccionadas transversalmente, desidratadas em álcool, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina sob a forma de blocos. Os blocos foram montados no micrótomo e obtidos cortes com 5µm de espessura e, a seguir, submetidas à coloração Hematoxilina/Eosina (HE).

Análise histomorfológica da reação inflamatória

Para avaliação das características histomorfológicas associadas ao processo inflamatório/reparativo, foram analisadas as secções histológicas coradas em HE, observando-se os seguintes critérios: intensidade e tipo do infiltrado inflamatório

A intensidade do processo inflamatório foi observada e determinada de acordo com os seguintes critérios: (+1) – quando as células inflamatórias, independente de seu fenótipo, constituíram menos de 10% da população celular observada na área da ferida cirúrgica; (+2) – quando as células inflamatórias, independente de seu fenótipo, constituíram entre 10% a 50% da população celular observada na área da ferida

cirúrgica. (+3) – quando as células inflamatórias, independente de seu fenótipo, constituíram mais de 50% da população celular observada na área da ferida cirúrgica

A tipagem da reação inflamatória foi determinada considerando-se a análise quantitativa das diferentes células inflamatórias individualmente, a saber: neutrófilos, eosinófilos, linfócitos, plasmócitos e macrófagos, identificadas pela sua morfologia específica. Desta forma, esta análise obedeceu aos seguintes critérios: (+)1 – quando o fenótipo celular estudado correspondeu a menos de 10% do total de células inflamatórias sediadas na área da ferida cirúrgica; (+2) – quando o fenótipo celular estudado correspondeu a mais de 10 e menos de 50% do total de células inflamatórias sediadas na área da ferida cirúrgica; (+3) – quando o fenótipo celular estudado correspondeu a mais de 50% do total de células inflamatórias sediadas na área da ferida cirúrgica. Após a semi-quantificação, a reação inflamatória foi categorizada de acordo com o fenótipo inflamatório predominante em Inflamação aguda (quando predominaram neutrófilos e/ou eosinófilos), inflamação subaguda (quando houve equilíbrio entre neutrófilos/eosinófilos e linfócitos/plasmócitos.); inflamação crônica inespecífica (quando predominaram linfócitos e/ou plasmócitos); e inflamação crônica granulomatosa (quando predominaram macrófagos e/ou gigantócitos).

Determinação do índice percentual de epitelização da superfície da ferida

O índice de reepitelização da superfície da ferida foi avaliado observando-se a formação de epitélio pavimentoso estratificado na região correspondente a superfície da ferida cirúrgica. Para obtenção deste índice, foram selecionadas 04 imagens previamente fotomicrografadas de cada secção histológica. Estas foram processadas em um software específico para morfometria Image Tool[®], onde foi determinado o número de pixels correspondente a área de extensão ocupada pela faixa de epitelização na superfície da ferida e a extensão total da superfície da ferida. Posteriormente foi determinado o percentual de epitelização (E_p) em cada caso, calculando-se a razão entre a extensão superficial ocupada pelo epitélio neoformado (E_{ex}) e a extensão total do ferimento (E_T), multiplicado por 100, de acordo com a seguinte fórmula: $E_p = (E_{ex} / E_T) \times 100$, onde:

E_p – Percentual de epitelização

E_{ex} – extensão superficial ocupada pelo epitélio neoformado

E_T – extensão total do ferimento

Análise do comportamento da microvasculatura

Para avaliação do comportamento vascular foram analisadas duas variáveis: número médio de vasos por campo histológico e perímetro vascular médio. Para operacionalização deste estudo, foi procedida a aquisição de imagens referentes a cada caso estudado. Assim, para cada caso foram confeccionadas 5 secções histológicas seriadas de 5µm de espessura, separadas entre si por uma distância de 10µm; em cada lâmina foram fotomicrografados 10 campos histológicos (ampliação de 400x) selecionados por casualização sistemática. Desta forma, os campos foram selecionados da esquerda para direita e de cima para baixo; para cada campo selecionado seguiu-se dois campos desprezados, até que se atinja o total de 20 campos. As imagens fotomicrografadas foram digitalizadas por meio de software de captura de imagens Olympus 2000®. Após digitalização, as imagens referentes a cada campo histológico foram projetadas em monitor Samsung® de 14”, com sobreposição de um retículo contendo 100 pontos testes em quadrículas (totalizando 1000 pontos contados em cada lâmina analisada). Este recurso facilita a seleção das estruturas a serem mensuradas na análise morfométrica das variáveis dependentes, além de impedir sua recontagem.

O número médio de vasos sanguíneos foi determinado pela contagem de vasos capilares seccionados transversalmente em cada campo histológico. A média foi obtida por meio da razão entre o somatório de vasos contados e o quantitativo de campos analisados.

Para determinação do perímetro vascular médio foi utilizado o software *Image Tool*®. Assim, as imagens dos campos histológicos capturados previamente foram processadas no software, e o perímetro de cada vaso capilar seccionado transversalmente em cada campo histológico foi determinado. O perímetro médio foi definido por meio da razão entre o somatório de todos os perímetros obtidos e o quantitativo de vasos analisados. Foram considerados apenas os vasos sanguíneos com diâmetro superior a 20 micrômetros, conforme recomendado por PRADO *et al.* (2000).

Análise Estatística

Os dados obtidos a partir da análise da determinação da intensidade da reação inflamatória foram comparados entre os grupos experimentais e controles (14 e 21 dias) de maneira puramente descritiva.

Para análise da existência ou não de diferenças estatisticamente significativas no índice percentual de epitelização, número médio de vasos neoformados e perímetro vascular médio, as médias de cada grupo, tanto em 7 como em 14 dias, foram submetidos ao teste Kolmogorov Smirnov (KS) para avaliação da normalidade dos dados. Posteriormente, aplicou-se o teste ANOVA, seguida do teste de Tukey, para verificação de existência de diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Resultados

Conforme apresentado na tabela 1, ao sétimo dia todos os grupos ainda mostravam uma infiltração inflamatória bastante significativa. O padrão de infiltração inflamatória no grupo controle (G1) foi agudo em função do patente predomínio de neutrófilos, especialmente na porção média e superficial da ferida, em detrimento dos linfócitos, que abundavam mais na profundidade do espécime. Nos grupos experimentais a infiltração foi categorizada como subaguda em razão da observação de uma quantidade mais expressiva de leucócitos mononucleares (linfócitos e plasmócitos) em adição aos polimorfonucleares (neutrófilos). No entanto, o grupo tratado com membrana de colágeno (G2) exibiu maior infiltração linfocítica, enquanto que aquele tratado com membrana de colágeno contendo própolis (0,1%) demonstrou substancial infiltração plasmocitária, especialmente nas porções mais profundas do espécime.

De especial interesse foi a observação de que o edema intersticial foi bem mais marcante no grupo G1 quando comparado aos demais, sendo que em G3 este pareceu menos evidente. Por outro lado, a expressão morfológica da reação de granulação em G3 pareceu mais madura, posto que se percebia nitidamente uma maior abundância de células fusiformes fasciculadas, interpretadas como fibroblastos ativos (figura 1).

Tabela 1: Análise morfológica da reação inflamatória nos grupos controle (G1), tratados com membrana de colágeno (G2) e tratados com membrana de colágeno contendo própolis (G3) sacrificados ao sétimo dia após a experimentação cirúrgica.

INFLAMAÇÃO		ANIMAIS				
		(R1)	(R2)	(R3)	(R4)	(R5)
G1	Intensidade da inflamação	+3	+3	+3	+3	+3
	Neutrófilos	+3	+3	+3	+3	+3
	Linfócitos	+2	+2	+2	+2	+2
	Plasmócitos	+2	+1	+1	+2	+1
	Macrófagos	+1	+1	+1	+1	+1
G2	Intensidade da inflamação	+3	+3	+3	+3	+3
	Neutrófilos	+2	+2	+2	+2	+2
	Linfócitos	+2	+3	+1	+2	+3
	Plasmócitos	+2	+2	+2	+2	+2
	Macrófagos	+2	+2	+2	+2	+2
G3	Intensidade da inflamação	+3	+3	+3	+3	+3
	Neutrófilos	+2	+2	+2	+2	+2
	Linfócitos	+1	+1	+1	+1	+1
	Plasmócitos	+3	+2	+2	+2	+3
	Macrófagos	+1	+1	+1	+1	+1

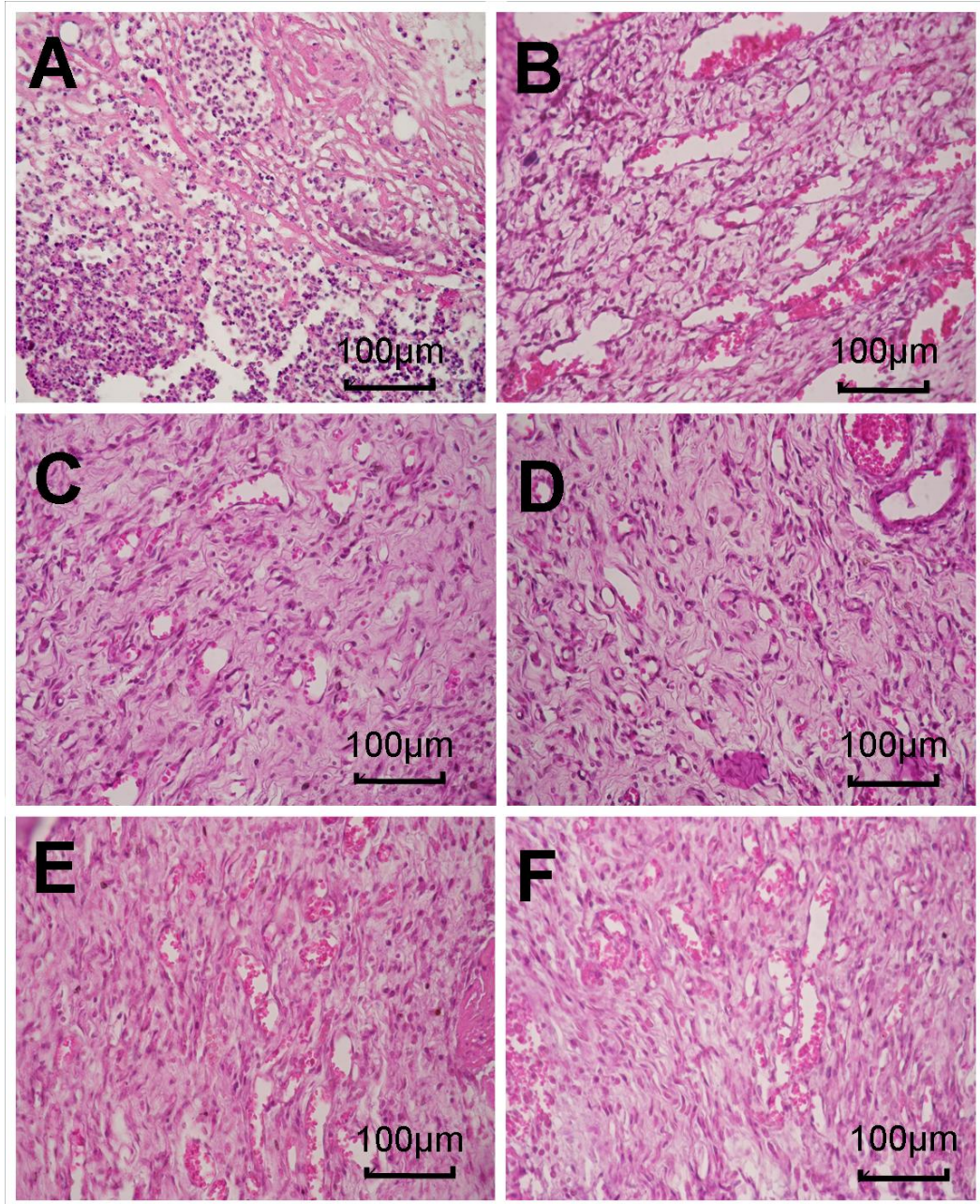


Figura 2. (A) Intensa infiltração neutrofílica superficial e linfocítica na profundidade, com proeminente edema intersticial (B) em G1; redução do edema e infiltração linfocítica em G2 (C e D); reação de granulação exuberante e proliferação fibroblástica evidente em G3 (E e F) (HE, 100x).

De acordo com os dados expressos na tabela 2, ao décimo quarto dia, a intensidade da reação inflamatória sofreu redução em todos os grupos, embora esta tenha se mostrado menos substancial no grupo controle (G4) que nos grupos experimentais (G5 e G6). Todos os grupos exibiram reação inflamatória residual composta predominantemente por linfócitos e plasmócitos, embora G4 tenha se caracterizado por infiltração eminentemente linfocítica. Em G5 a infiltração por linfócitos mostrou-se mais evidente, enquanto que em G6 o padrão inflamatório observado foi tipicamente plasmocitário. A presença de fagócitos mono ou

multinucleares foi inconspícua em praticamente todos os espécimes estudados. Em nenhum grupo foi evidenciado qualquer indício de edema intersticial. Além disso, todos os grupos mostravam marcada proliferação fibroblástica e considerável deposição colagênica, embora no grupo controle esta tenha se mostrado menos proeminente.

Tabela 2. Análise morfológica da reação inflamatória nos animais pertencentes aos grupos controle (G1), tratados com membrana de colágeno (G2) e tratados com membrana de colágeno contendo própolis (G3) sacrificados ao décimo quarto dia após a experimentação cirúrgica.

INFLAMAÇÃO		(R1)	(R2)	(R3)	(R4)	(R5)
G4	Intensidade da inflamação	+2	+1	+2	+2	+2
	Neutrófilos	+1	+1	+1	+1	+1
	Eosinófilos	+1	+1	+1	+1	+1
	Linfócitos	+3	+3	+3	+3	+3
	Plasmócitos	+2	+1	+2	+1	+2
	Macrófagos	+1	+1	+1	+1	+1
	Gigantócitos	+1	+1	+1	+1	+1
G5	Intensidade da inflamação	+1	+1	+1	+1	+1
	Neutrófilos	+1	+1	+1	+1	+1
	Eosinófilos	+1	+1	+1	+1	+1
	Linfócitos	+3	+3	+3	+3	+3
	Plasmócitos	+2	+2	+2	+2	+2
	Macrófagos	+1	+1	+1	+1	+1
	Gigantócitos	+1	+1	+1	+1	+1
G6	Intensidade da inflamação	+1	+1	+1	+1	+1
	Neutrófilos	+1	+1	+1	+1	+1
	Eosinófilos	+1	+1	+1	+1	+1
	Linfócitos	+1	+2	+1	+1	+2
	Plasmócitos	+3	+3	+2	+3	+2
	Macrófagos	+2	+1	+1	+1	+2
	Gigantócitos	+1	+1	+1	+1	+1

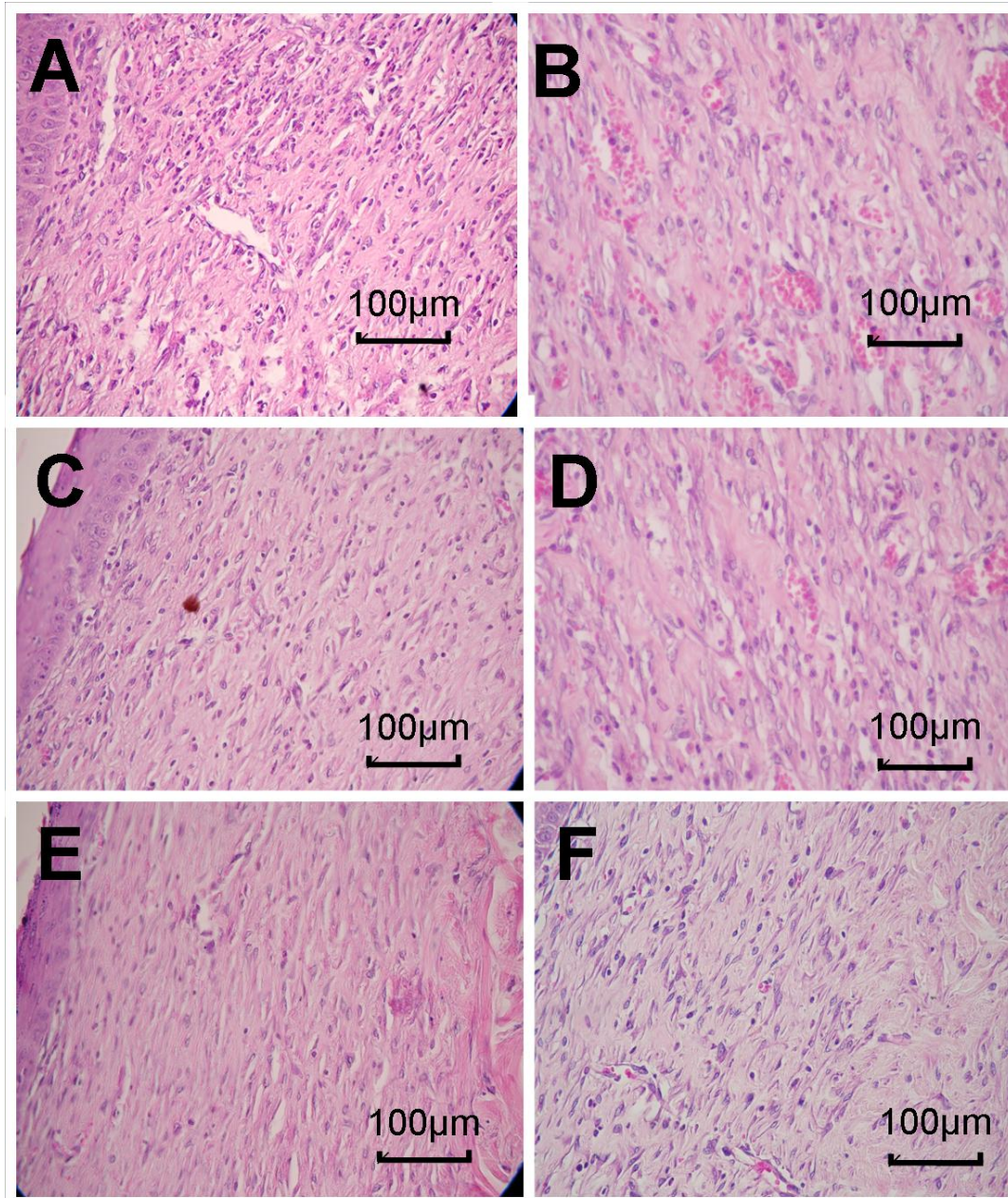


Figura 2. Reação inflamatória linfoplasmocitária residual em G1 (A), acompanhada de rico leito vascular (B); Os grupos G2 (C e D) e G3 (E e F) mostram ambos escassa infiltração leucocitária residual e tecido cicatricial fibroso bem formado (HE, 100x).

O percentual médio de reepitelização da superfície da ferida ao sétimo dia foi de $26,38 \pm 5,77\%$ em G1, $33,09 \pm 14,94\%$ em G2 e $39,51 \pm 3,77\%$ em G3 (figura 3). Apesar desta diferença não ter sido considerada estatisticamente significativa ($p=0,203$), observou-se uma clara tendência a uma melhor reepitelização nos grupos experimentais, especialmente em G3.

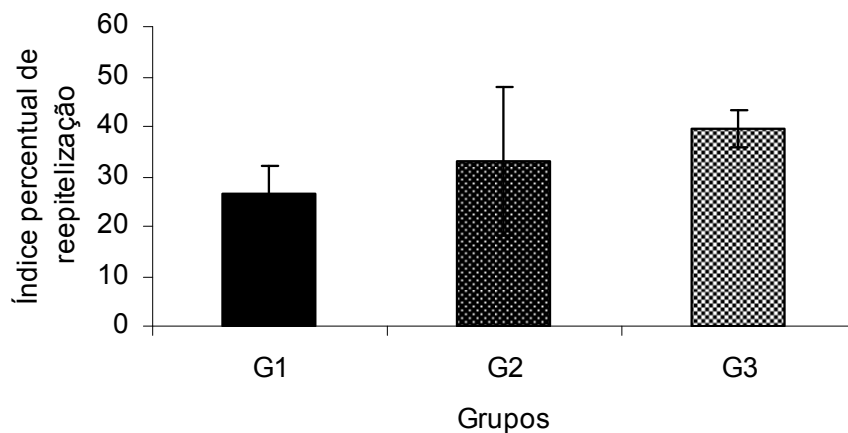


Figura 3. Distribuição dos índices percentuais médios de reepitelização da superfície das feridas ao sétimo dia nos três grupos estudados.

Ao décimo quarto dia, apenas dois animais do grupo controle (G4) não demonstraram reepitelização completa da superfície da ferida (média de $89,82 \pm 14,85\%$). Os demais grupos exibiram reepitelização total da ferida (figuras 4 e 5). Contudo, essa diferença não foi significativa ($p=0,19$).

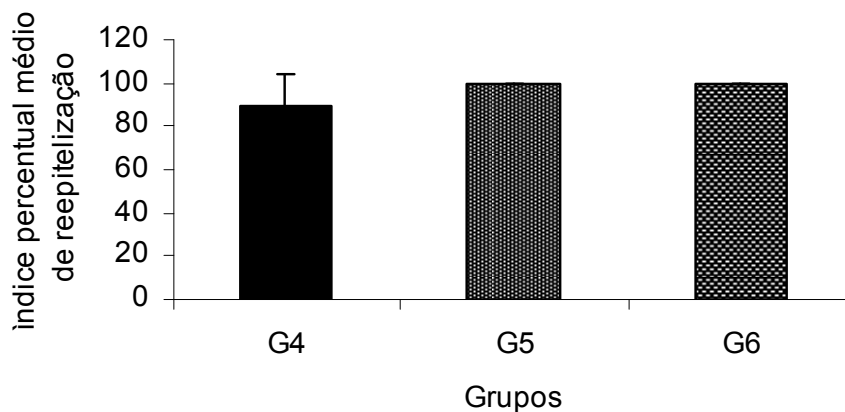


Figura 4. Distribuição dos índices percentuais médios de reepitelização da superfície das feridas ao sétimo dia nos três grupos estudados.

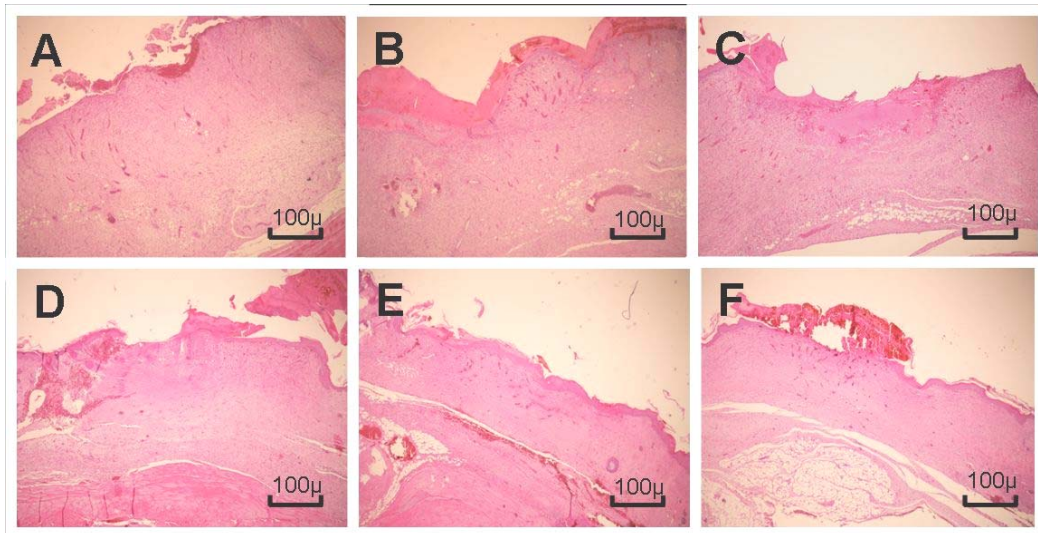


Figura 5. Fotomicrografias das feridas cirúrgicas exibindo reepitelização ainda incompleta em G1 (A), G2 (B) e G3 (C) em sete dias. Ao décimo quarto dia, apenas G4 (D) houve espécimes com reepitelização incompleta, enquanto que G5 (E) e G6 (F) demonstraram total reepitelização da superfície da ferida (HE, 40x).

Com relação à análise do comportamento da microvasculatura (figura 6), verificou-se haver, em sete dias, diferenças estatisticamente significativas no quantitativo de vasos sanguíneos entre os grupos estudados ($p=8,9E-07$). Assim, observou-se que o número médio de vasos em G1 foi $14,18\pm 7,28$, significativamente maior que a média de $7,65\pm 4,65$ obtida em G2 ($p=1,02E-05$) e a de $8,35\pm 5,63$ observada em G3 ($p=0,0001$). No entanto, os grupos experimentais (G2 e G3) não mostraram diferença significativa entre eles ($p=0,5$). Ao décimo quarto dia, contudo, a média de vasos em G4 foi de $5,90\pm 4,33$, enquanto que em G5 foi de $6,66\pm 3,12$ e em G6 de $5,04\pm 2,89$ (figura 7). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p=0,108$).

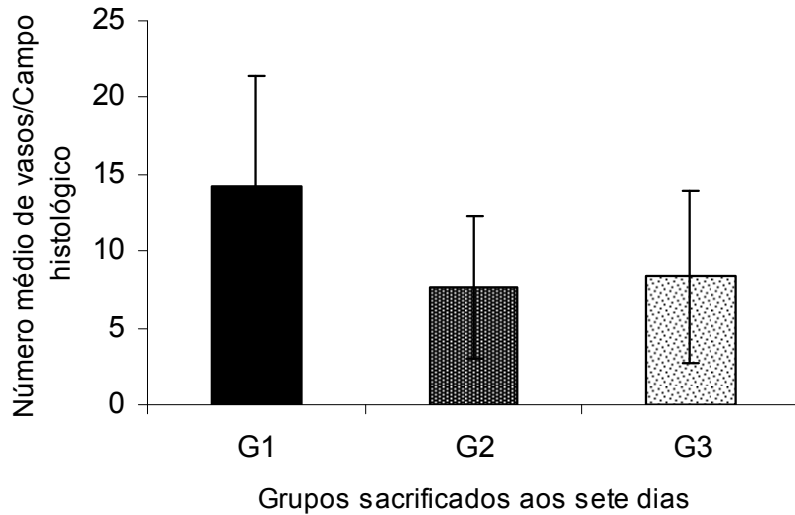


Figura 6. Análise quantitativa do número médio de vasos sanguíneos por campo histológico nos grupos sacrificados sete dias após os procedimentos cirúrgicos.

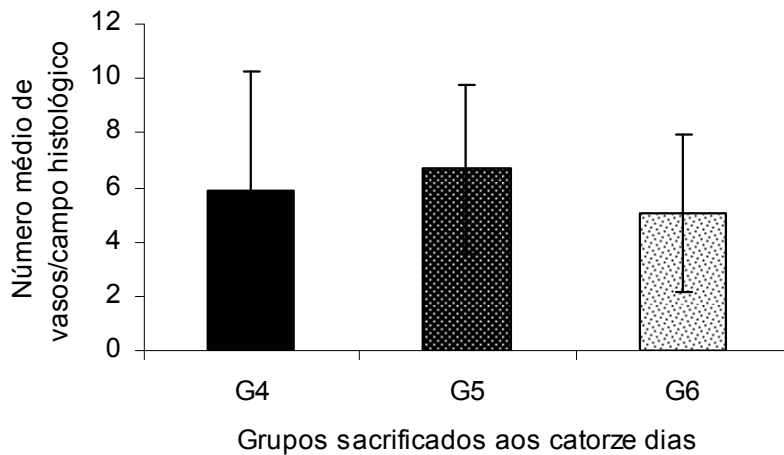


Figura 7. Análise quantitativa do número médio de vasos sanguíneos por campo histológico nos grupos sacrificados catorze dias após os procedimentos cirúrgicos.

Com relação ao perímetro vascular médio ao sétimo dia (figura 8), não foi observada diferenças estatisticamente significativas entre G1 ($684,27 \pm 287,04 \text{ pixels}^2$), G2 ($726,19 \pm 280,93 \text{ pixels}^2$) e G3 ($706,92 \pm 276,71 \text{ pixels}^2$) ($p=0,215$). Já aos 14 dias (figura 9), foi detectada diferenças entre as médias ($p=1,81E-23$); desta forma, o perímetro médio observado em G4 ($1295,36 \pm 676,4 \text{ pixels}^2$) foi significativamente maior que em G5 ($810,09 \pm 422,94 \text{ pixels}^2$) ($p=4,88E-20$) e em G6 ($796,52 \pm 550,12 \text{ pixels}^2$) ($p=2,04E-16$). Contudo, os dois grupos experimentais (G5 e G6) não exibiram diferença estatística entre si ($p=0,75$).

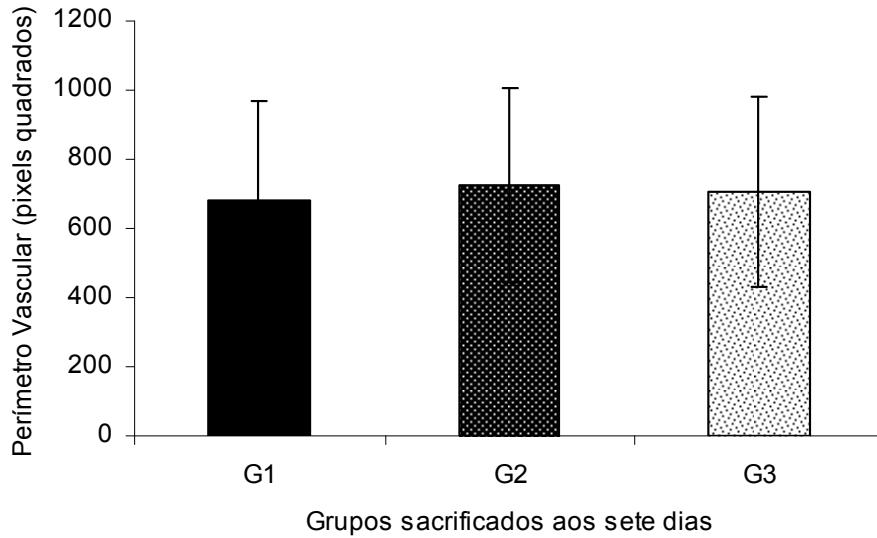


Figura 8. Análise quantitativa do perímetro vascular médio nos grupos sacrificados sete dias após os procedimentos cirúrgicos

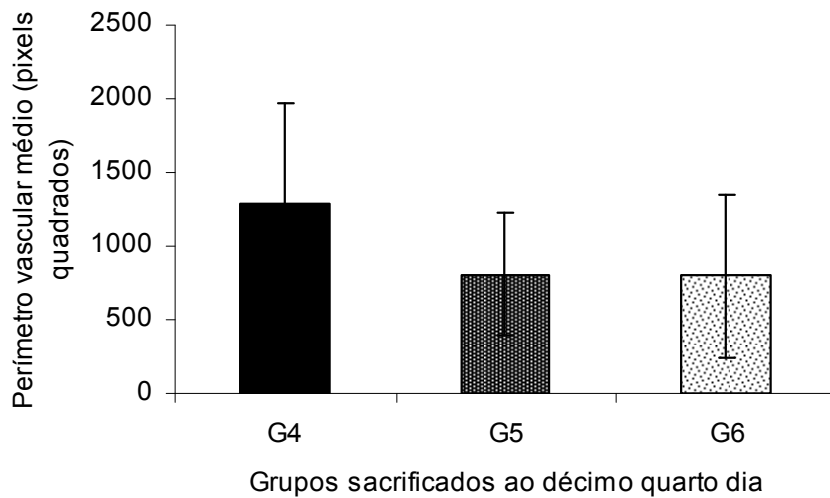


Figura 9. Análise quantitativa do perímetro vascular médio nos grupos sacrificados catorze dias após os procedimentos cirúrgicos

Discussão

O processo de cicatrização por segunda intenção caracteriza-se por indução do reparo em feridas com perda maior de células e tecidos. A reação de granulação cresce a partir da margem para completar a reparação. Como em feridas extensas não há união das bordas, existe formação do coágulo de fibrina que preenche o defeito e mais detritos necróticos e exsudatos devem ser removidos. O fator que diferencia a

cicatrização primária da secundária refere-se ao fenômeno da contração da ferida. As etapas iniciais da contração da ferida envolvem a formação de rede de fibroblastos contendo actina na margem da ferida (KUMAR, ABBAS e FAUSTO, 2005).

No presente trabalho, a dinâmica da reparação cicatricial em resposta ao tratamento com membranas de colágeno contendo extrato hidroalcoólico de própolis vermelha foi estudada em modelo murino. Observou-se que, ao sétimo dia, a intensidade da reação inflamatória foi similar entre os grupos estudados. Assim, os resultados sugerem que o tratamento com membrana de colágeno, contendo ou não a própolis vermelha, não pareceu exibir propriedades antiinflamatórias.

A manutenção da resposta inflamatória no grupo tratado com biofilme de colágeno numa intensidade similar àquela observada no grupo controle parece encontrar sólido respaldo na literatura vigente (SRIVASTAVA *et al.*, 1990; SEMENOFF SEGUNDO *et al.*, 2007), posto que, apesar de apresentar numerosas características biomodulatórias, não tem sido relatada qualquer associação entre o colágeno I e atividade antiinflamatória.

A resposta inflamatória inicial, que precede os fenômenos proliferativos da reparação cicatricial, é do tipo aguda, caracterizada, portanto, pela migração em massa de leucócitos polimorfonucleares neutrófilos. Esta reação, contudo é fugaz e dura, em média, 03 dias, quando começa a haver substituição gradativa dos neutrófilos por células mononucleares, especialmente linfócitos e plasmócitos (PEREIRA PINTO *et al.*, 1997). Esperava-se, portanto, que ao sétimo dia do experimento, a reação inflamatória fosse predominantemente composta por estes últimos constituintes celulares.

Contudo, ao se analisar o padrão histomorfológico de infiltração leucocitária, observa-se que a inflamação é predominantemente aguda no grupo controle, mas subaguda, com relevante infiltração linfocítica, no grupo tratado com biofilme de colágeno I.

A interpretação destes achados perpassa o conhecimento da dinâmica dos fenômenos imuno-inflamatórios que tomam sede nos tecidos lesados durante o reparo cicatricial. Desta forma, nos estágios iniciais da resposta do hospedeiro à agressão, o influxo de neutrófilos é determinado pela ação de mediadores químicos liberados durante o processo de injúria tissular, a exemplo das prostaglandinas e leucotrienos (BALBINO, PEDREIRA e CURI, 2005). No entanto, deve ser lembrado que a duração da fase neutrofílica da resposta inflamatória durante este tipo de resposta reparativa é proporcional ao grau de liberação de quimiocinas, que, por sua vez é diretamente

dependente da intensidade da injúria e do grau de contaminação da ferida (RIBEIRO, 2006).

O fato de que no grupo controle a reação inflamatória permaneceu aguda mesmo aos sete dias, superando em muito a média de três dias classicamente descrita na literatura, provavelmente ocorreu em resposta à maior contaminação secundária da ferida, uma vez que estas ficavam expostas durante a cicatrização por segunda intenção.

A observação de maior infiltração linfocítica em detrimento da infiltração neutrofílica no grupo tratado com biofilme de colágeno I em comparação ao grupo controle sugere uma baixa liberação de quimiocinas no sítio anatômico de flogose e, por consequência, uma transição mais rápida do fenótipo leucocitário de polimorfo para mononuclear. No entanto, é preciso ressaltar que essa redução não nos pareceu estar associada à composição físico-química da membrana, mas sim à proteção mecânica da ferida, o que sabidamente reduz a contaminação microbiana e facilita a instalação e completude do reparo cicatricial (DIELGEMAN, EVANS, 2004).

Ao comparar os achados morfológicos do grupo controle com o grupo tratado com membrana de colágeno contendo própolis vermelha foi possível observar que a reação inflamatória continuou intensa, mas o perfil leucocitário mostrou-se distinto, uma vez que foi identificada uma considerável infiltração de plasmócitos.

Alguns estudos têm demonstrado que a própolis parece exercer um importante efeito imunomodulatório, inibindo a síntese de prostaglandinas e leucotrienos pelos macrófagos, além de ativar o timo, estimular a imunidade celular, especialmente a atividade fagocitária, e aumentar os efeitos cicatrizantes nos tecidos epiteliais (RUSSO, LONGO e VANELLA, 2002; ORSOLIC e BASIC, 2003).

A infiltração mononuclear plasmocitária observada no grupo tratado com biofilme de colágeno contendo própolis pode, portanto, refletir o amplo espectro de atividades imunomodulatórias exercido pela própolis vermelha durante a dinâmica do processo de reparo. A inibição da síntese de prostaglandinas, um importante mediador da quimiotaxia leucocitária, e o estímulo à fagocitose, promovendo a eliminação mais rápida de microrganismos infectantes, ao mesmo tempo em que concorreriam para a redução da população neutrofílica, facilitariam o desenrolar dos fenômenos imunológicos de ativação e diferenciação de linfócitos B em plasmócitos.

Assim, parece lúcido sugerir que a maior diferenciação plasmocitária observada no grupo tratado com própolis venha representar um reflexo morfológico da ação imunomodulatória da própolis vermelha, que poderia ter contribuído para a

aceleração dos fenômenos característicos da evolução da resposta imuno-inflamatória.

Não foi observada redução significativa da intensidade da inflamação no grupo tratado com biofilme de colágeno contendo própolis, fenômeno que seria esperado em virtude da atividade imunomodulatória deste produto natural. Este achado pode estar relacionado à baixa concentração da própolis vermelha utilizada neste estudo.

Contudo, é de extrema relevância destacar que a reação inflamatória representa o evento inicial que se segue à lesão tissular e tem como função básica a eliminação do agente flogógeno e, em última instância, reparação dos danos tissulares provocados pela agressão (STEVENS; LOWE, 2002). Compreende-se, pois, que a inflamação é absolutamente necessária ao processo de reparo, embora, quando se manifeste em elevada intensidade ou se mantenha por tempo demasiado, este fenômeno seja o principal agente retardador da cicatrização (PEREIRA PINTO *et al.*, 1997).

No presente estudo, não foi observado persistência de edema, formação de abscesso ou fistulação (dados não mostrados), que representariam sinais indicativos de resposta imunoinflamatória aguda exacerbada em nenhum dos grupos, independente do tratamento oferecido aos animais. Infere-se, pois, que a intensidade da resposta inflamatória observada nos três grupos, apesar de categorizada como intensa, não pôde ser considerada exacerbada e, por conseqüência, não pareceu influenciar negativamente a instalação dos fenômenos que caracterizam o processo de reparo.

Ao décimo quarto dia, houve redução substancial da reação inflamatória em todos os grupos, achado já esperado, uma vez que representa a evolução natural do processo cicatricial (DIEGELMAN, EVANS, 2004). No entanto, a redução da infiltração leucocitária foi mais evidente nos grupos experimentais (G5 e G6) que no controle (G4), embora os dois primeiros tenham mostrado magnitude inflamatória similares.

Deve ser lembrado que os resultados obtidos na primeira fase do estudo pareceram indicar que o emprego de membranas de colágeno, independente de conter ou não o extrato hidroalcoólico de própolis vermelha, não exerceu efeito antiinflamatório evidente. Assim, a interpretação dos dados obtidos na segunda fase do experimento parece conduzir a idéia de que a redução da infiltração leucocitária verificada nos grupos experimentais poderia estar mais associada à proteção mecânica da ferida, o que sabidamente reduz a contaminação microbiana e facilita a instalação e completude do reparo cicatricial, do que à uma provável propriedade

antiinflamatória secundária à composição físico-química das membranas ou da própolis.

No entanto, o padrão de infiltração residual também foi diferente nos grupos sacrificados ao décimo quarto dia, uma vez que a infiltração de plasmócitos mostrou-se mais conspícua nos grupos experimentais que no controle, especialmente em G6 (membrana/própolis), onde o infiltrado era predominantemente plasmocitário.

Considerando que plasmócitos são células produtoras de anticorpos originadas a partir da ativação e diferenciação fenotípica de células B e que seu acúmulo ocorre nas etapas finais da dinâmica da resposta imunológica (RIBEIRO, 2006), seria lúcido especular que a maior infiltração plasmocitária evidenciada nos grupos experimentais poderia tão somente indicar que o fenômeno de reparação estaria em fases mais tardias nestes grupos que no grupo controle.

Adicionalmente, alguns estudos têm demonstrado que a própolis parece exercer um importante efeito imunomodulatório, inibindo a síntese de prostaglandinas e leucotrienos pelos macrófagos, além de ativar o timo, estimular a imunidade celular, especialmente a atividade fagocitária, e aumentar os efeitos cicatrizantes nos tecidos cicatriciais (RUSSO, LONGO e VANELLA, 2002; ORSOLIC e BASIC, 2003).

Assim, parece lúcido sugerir que a maior diferenciação plasmocitária observada no grupo tratado com própolis venha representar um reflexo morfológico da ação imunomodulatória da própolis vermelha, que, aliada à proteção mecânica oferecida pela membrana de colágeno, poderia ter contribuído para a aceleração dos fenômenos característicos da evolução da resposta imuno-inflamatória vista em G6. Admite-se, pois, que a associação entre a própolis vermelha e a membrana de colágeno mostrou-se eficaz em modular o padrão de resposta inflamatória, o que viria a acelerar a instalação do reparo cicatricial.

Estudos têm demonstrado uma relação íntima entre a proliferação fibroblástica, deposição de colágeno e a epitelização da superfície de feridas cutâneas (McDOUGALL *et al.*, 2006). Neste processo, as moléculas de colágeno I parecem funcionar como uma matriz que orienta a migração de células epiteliais, endoteliais, fibroblastos e leucócitos (MORIMOTO *et al.*, 2005).

No presente estudo, não foi observada diferença estatisticamente significativa no grau de reepitelização da superfície da ferida entre os grupos estudados em nenhuma das fases do estudo. No entanto, em sete dias, foi observada certa tendência a maior reepitelização percentual nos grupos experimentais, notadamente em G3. O mesmo padrão foi evidenciado ao décimo quarto dia, embora nestes casos a reepitelização já estivesse bem mais avançada em todos os grupos.

Tem sido atribuído ao colágeno tipo I um papel fundamental na dinâmica da cicatrização, não apenas por representar o principal elemento protéico do parênquima cicatricial (LELIEVRE, BONVALET e BRY, 1998), mas também devido a íntima relação entre esta proteína e os fenômenos de proliferação e migração celular, provavelmente em resposta a ligação entre integrinas de superfície celular (ceratinócitos e fibroblastos) e esta molécula protéica, ativando receptores de uma série de proteínas quinases associadas ao ciclo celular (SHRIVASTAVA *et al.*, 1990; HAGA *et al.*, 2005). Assim, as moléculas de colágeno I parecem funcionar como uma matriz que orienta a migração celular durante a reparação cicatricial. (MORIMOTO *et al.*, 2005), o que viria a justificar a tendência a maior crescimento epitelial (ceratinócitos) nos grupos tratados com membranas (G2, G3, G5 e G6).

Ressalta-se que, em sete dias, a tendência a maior reepitelização foi verificada no grupo tratado com própolis vermelha. Tais achados são suportados por estudos prévios demonstrando que alguns componentes da própolis, como ésteres de ácido cafeico, são capazes de estimular a proliferação de ceratinócitos epidérmicos (BRUDZYNSKI e CARLONE, 2004). O fato de que não houve diferença estatisticamente significativa quando comparado ao controle poderia, neste contexto, refletir tanto a baixa concentração do extrato hidroalcoólico empregada neste ensaio como a variabilidade nas propriedades bioativas que caracterizam os diferentes tipos de própolis.

Outro aspecto de fundamental importância para o desenvolvimento a contento do reparo cicatricial por segunda intenção é a instalação da reação de granulação (RIBEIRO, 2006). A formação da reação de granulação se desenvolve a partir do terceiro a quarto dia pós-agressão e ocorre às expensas da invasão da área de injúria tissular por vasos sanguíneos capilares neoformados (ABRAHAM e KLABSBRUN, 1996), e fator de crescimento endotelial vascular (BROWN *et al.*, 1992). Infere-se, pois, que a análise da densidade vascular (número médio de vasos por campo histológico) pode representar um importante parâmetro de avaliação da progressão da reação de granulação em direção ao reparo cicatricial.

A maior densidade vascular identificada em G1 pode refletir uma estimulação exacerbada da proliferação endotelial por citocinas liberadas por células inflamatórias. Deve ser lembrado que, no grupo controle, onde não houve proteção da ferida, a maior possibilidade de contaminação bacteriana poderia ter determinado uma maior atividade flogística e quimiotática na área de cicatrização, e, em última instância, levado a maior liberação *in loco* de citocinas responsáveis pela proliferação endotelial.

Entretanto, não houve diferença entre os grupos G2 e G3, apesar de relatos prévios indicarem que a própolis exibe atividade antiangiogênica (SONG *et al.*, 2002). Esses dados conflitantes podem mais uma vez ter relação com a concentração empregada ou com a variedade botânica da própolis utilizada neste estudo.

A densidade vascular ao décimo quarto dia foi substancialmente mais baixa, e não mostrou diferença entre os grupos, corroborando os relatos de Mandelbaum *et al.* (2003), que afirmam que nas fases tardias do reparo a vascularização é inconspícua, cedendo espaço à síntese ativa, deposição e remodelação do colágeno.

Na primeira fase do experimento não houve diferença entre os grupos no perímetro vascular médio; no entanto na segunda fase, o grupo controle (G4) exibiu vasos significativamente mais dilatados que os experimentais.

Considere-se que a intrincada interação da rede microvascular com componentes de matriz extracelular que caracteriza a reação de granulação funciona como reservatório complexo de fatores de crescimento que estimulam a proliferação e migração fibroblástica para o interior da ferida, além de aumentar o aporte de oxigênio na área lesada, garantindo uma melhor síntese de colágeno. À medida que o colágeno é depositado e maturado, ocorre compressão de vasos sanguíneos capilares, levando as células endoteliais a sofrerem apoptose, de maneira tal que a reação de granulação ricamente vascularizada é substituída progressivamente por tecido cicatricial relativamente hipocelular e hipovascular (DESMOULIERE *et al.*, 1995).

Assim, na primeira fase do experimento, quando a deposição colagênica é sensivelmente menos pronunciada e o fenômeno de compressão vascular inconspícuo, o perímetro vascular mostrou-se similar nos três grupos. Na segunda fase, porém, apesar de haver evidente colagenização da área cicatricial em todos os grupos, esta pareceu menos intensa em G4 (controle). O aparente retardo na evolução da cicatrização, provavelmente secundário ao já discutido padrão de inflamação e de desenvolvimento da reação de granulação nas fases iniciais do grupo controle, poderia ter resultado em menor deposição colagênica e conseqüente menor compressão vascular, expressa morfológicamente por vasos sanguíneos com maior perímetro transversal médio. Desta forma, seria lúcido sugerir uma relação estreita entre a evolução dos eventos cicatriciais e a redução do perímetro vascular médio dos vasos residuais formados durante a etapa ativa da reação de granulação nas fases tardias da cicatrização.

Por outro lado, a ausência de diferença estatisticamente significativa entre os grupos G5 e G6 sugere que a incorporação do extrato hidroalcoólico de própolis

vermelha não parece ter influenciado o padrão de evolução cicatricial a ponto de interferir no valor médio do perímetro dos vasos capilares residuais.

A análise global dos resultados obtidos no presente estudo indica que a utilização de membranas de colágeno tipo-I contendo extrato hidroalcoólico de própolis vermelha a 0,1% propiciou melhorias importantes no desenrolar dos fenômenos biológicos que caracterizam o processo de reparo cicatricial por segunda intenção.

As implicações clínicas dos achados apresentados são de extrema relevância, uma vez que as características físico-químicas e estruturais dos biofilmes de colágeno contendo própolis vermelha utilizados nesta pesquisa podem permitir seu emprego em uma ampla gama de condições clínicas onde haja desnudamento epitelial ou ulceração com perda de substância, sem possibilidade de coaptação de bordas. No âmbito da Odontologia, parece possível extrapolar os resultados para o tratamento de cirurgias cruentas intra-orais, em que seja necessária a reparação por segunda intenção, como cirurgias por eletrocauterização, cirurgias periodontais e frenectomias, em substituição aos cimentos cirúrgicos convencionais. Além disso, o presente estudo descortina um amplo campo de pesquisa com própolis vermelha em outras patologias e agravos à saúde.

No entanto, a despeito de todas as vantagens supramencionadas, estudos posteriores são necessários para elucidar todos os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na dinâmica da estimulação do processo de cicatrização evidenciado neste ensaio biológico preliminar antes de iniciar quaisquer ensaios clínicos.

Referências

ABRAHAM, J.A.; KLAGSBRUN, M. *Modulation of Wound Repair by Members of the Fibroblast Growth Factor Family in: The Molecular and Cell Biology of Wound Repair*, p.195-248, 2 ed. New York, 1996.

ARAÚJO, C.F.R.; SOUZA, F.Z.A.; GRECA, F.H.; GUERREIRO, M.H.C.P.M.; LEITE, A. L., MANSUR, A.E.C.; KANTOR, D.C.; NASSIF, A.E. Efeito do agarol e do trigliceril sobre a cicatrização da pele. Estudo experimental em ratos. *Acta Cir. Bras.*, 13(4): 232-237, 1998.

BALBINO, C.A.; PEDREIRA, L.M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. *Rev. Brás. de Ciências Farmacêuticas*. 41 (1), Jan/Mar 2005.

BRASILEIRO FILHO, G. *Bogliolo Patologia*. 6 ed. Rio de Janeiro, 2000.

BROWN, L.F.; YEO, K.T.; BERSE, B.; YEO, T.K.; SENGER, D.R.; DVORAK, H.F.; VAN DE WATER, L. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) by epidermal keratinocytes during wound healing. *J Exp Med.* 176 (5):1375-9, 1992.

BRUDZYNSKI, K; CARLONE, R. Stage-dependent modulation of limb regeneration by caffeic acid phenethyl ester (CAPE)-immunocytochemical evidence of a CAPE-evoked delay in mesenchyme formation and limb regeneration. *J Exp Zoolog A Comp Exp Biol* 301:389–400, 2004.

CAMARGO, P.A.M.; CAMPOS, A.C.L.; MATIAS, J.E.F.; RISFOLI, D.Z.; PRZYSIEZNY, P.E.; FONSECA, V.R.; Efeito da mitomicina tópica na cicatrização da prega vocal em modelo suíno. *Rev. Bras. Otorrinolaringol.* 72(5): 601:4, 2006.

CARDOSO, J.C., **Modificação do colágeno pela reação de Maillard e avaliação de formulações na forma de gel desenvolvidas a partir do material modificado.** Tese de Doutorado, USP, Ribeirão Preto, Brasil, 2005.

CLARK, R.A.F. *Wound repair: overview and general considerations. In: The molecular and cellular biology of wound repair.* New York:Plenum Press, 1996.

DESMOULIERE, A.; REDARD, M.; DARBY, I.; GABBIANI, G. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *Am J Pathol*, 146 (1): 56-66, 1995.

DIEGELMANN, R.F.; EVANS, C.M. Wound healing an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Frontiers in Bioscience.*9: 283-89, 2004.

EULÁLIO, J.; DANTAS, A. N. M.; GÓES-NETO, A.; BARBOSA JÚNIOR, A. A. ; FREIRE, A. N.M. . Calcitonina Sintética de Salmão. *Rev. Col. Bras. Cir.* 34 (4): 237-244). 2007.

HAGA, H.; IRAHARA, C.; KOBAYASHI, R.; NAKAGAKI, T.; KAWABATA, K. Collective movement of epithelial cells on a collagen gel substrate. *Biophys J.*, 3: 2250-6, 2005.

HELARY, C.; OVTRACHT, L.; COULOMB, B.; GODEAU, G.; GIRAUD-GUILLE, M. M. Dense fibrillar collagen matrices: A model to study myofibroblast behaviour during wound healing. *Biomaterials.* 27(25): 4443-52. 2005.

KUMAR,V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N. *Robbins e Cotran Patologia – Bases Patológicas das Doenças*. Elsevier: Rio de Janeiro, p.112-118, 2005.

LEE,C.H.; SINGLA,A.; LEE,Y. Biomedical applications of collagen. *Int. J. Pharm.* 221 : 1-22, 2001.

LELIEVRE, E. ; BONVALET, C. ; BRY, X. Event history analysis of groups: the findings of an on-going research project. *Popul.* 1 : 11-38, 1998.

MANARA, L. R. B.; ANCONI, S. I.; GROMATZKY, A.; CONDE, M. C.; BRETZ, W.A. Utilização da própolis em odontologia. [The use of propolis in dentistry]. *Rev Fac Odontol Bauru.* 7(3/4):15-20. 1999.

MANDELBAUM, S.H.; DI SANTIS, É.P.; MANDELBAUM, M.H.S. Cicatrização, conceitos atuais e recursos auxiliares – Parte I. *An Brás Dermatol*, 78 (4): 393-410, 2003.

McDOUGALL, S.; DALLON, J.; SHERRATT, J./ MAINI, P. Fibroblast migration and collagen deposition during dermal wound healing: mathematical modeling and clinical implications. *Philos Transact A Math Phys Eng Sci.* 364 (1843): 1385-405, 2006.

MENEZES, H. Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. *Arq. Inst. Biol.*, 72 (3): 405-11, 2005.

MORIMOTO, N.; SASO Y.; TOMIHATA K.; TAIRA T.; TAKAHASHI Y.; OHTA M.; SUZUKI S. Viability and function of autologous and allogeneic fibroblasts seeded in dermal substitutes after implantation. *J Surg Res.* 125 (1): 56-67. 2005.

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

PARK, Y.K.; IKEGAKI, M.; ABREU, J.A.S.; ALCICIE, N.M.F. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. *Ciência e Tecnologia de Alimentos.* 18(3), 1998.

PEREIRA-PINTO, L.; SOUZA, L. B.; FREITAS, R. A., GALVÃO, H. C.; CÂMARA, M. L. A. S.; QUEIROZ, L. M. G., COSTA, A. L. L. *Patologia Básica – Sinopse*. 1 ed. Editora da UFRN, Natal, 1997.

RIBEIRO, M.A.G. **Estudo morfológico, histoquímico e imuno-histoquímico do processo de reparo subcutâneo em ratos submetidos a fotobiomodulação à Laser λ 660m**. Tese de Doutorado. Universidade Federal da Bahia/ Universidade Federal da Paraíba, Bahia, 2006.

RUSSO, A.; LONGO, R.; VANELLA, A. The role of the phenetyl ester of caffeic acid (CAPE) in the inhibition of rat lung cyclooxygenase activity by propolis. *Fitoterapia*, 73: 530-537, 2002.

SEMENOFF SEGUNDO, A.; BOSCO, A. F.; DA MAIA, D.; RIBEIRO, R.V.; DE AGUIAR, E.B.H.; ROCATTO, G.E.G.D.; CIRILO, D.M.; BUZELLE, S.L.; SEMENOFF, T.A.D.V. Influência do aloe vera e própolis na contração de feridas em dorso de ratos. *Periodontia*. 17 (01) : 05-10, 2007.

SONG, Y. S.; PARK, E. H.; JUNG, K.J.; JINC Inhibition of angiogenesis by propolis. *Arch. Pharm. Res.* 25 (4): 500-4. 2002.

SRIVASTAVA, S.; GORHAM. S.D.; FRENCH, D. A.; SHIVAS, A. A.; COURTNEY, J. M. In vivo evaluation and comparison of collagen, acetylated collagen and collagen/glycosaminoglycan composite films and sponges as candidate biomaterials. *Biomaterials*. 11(3):155-61 1990.

STEVENS, A.; LOWE, J. *Patologia*. 2ª ed., Ed Manole, Baueri/SP, 2002.

YAMATOIGI, R.S.; RAHAL, S.C.; GRANJEIRO, J.M.; TAGA, R.; CESTARI, T.M; LIMA, A.F.M.. Histologia da associação de membranas biológicas de origem bovina implantadas no tecido subcutâneo de ratos. *Ciência Rural*, 35(4): 837-842, 2005.

CAPÍTULO III
Análise quantitativa da população de mastócitos
durante a cicatrização de feridas tratadas com
membranas de colágeno contendo própolis vermelha.

Análise quantitativa da população de mastócitos durante a cicatrização de feridas tratadas com membranas de colágeno contendo própolis vermelha.

Quantitative analysis of mast cells during the healing of wounds treated with collagen membranes containing red propolis.

André Luiz Santos Barreto¹, Jônatas Almeida Pires², Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior^{3,4}, Juliana Cordeiro Cardoso^{3,5}.

Resumo

Mastócitos são células do tecido conjuntivo responsáveis pelo início da reação inflamatória e cronificação do processo, e desempenham um papel importante na dinâmica do reparo cicatricial. O uso de membranas biológicas naturais ou sintéticas no reparo de feridas dérmicas extensas, por sua vez, tem sido bastante discutido na literatura, especialmente aquelas à base de colágeno, devido à biocompatibilidade e interatividade desse material. A própolis é um produto natural que apresenta atividade antiinflamatória, podendo contribuir para a reparação cicatricial. A variedade vermelha desse produto, contudo, ainda é pouco estudada, existindo alguns relatos de uma provável ação cicatrizante. Assim, o objetivo deste trabalho foi analisar o efeito da associação de membranas de colágeno à própolis vermelha sobre a população de mastócitos durante o reparo cicatricial por segunda intenção em ratos. Para tanto, foram preparadas membranas de colágeno I extraído de tendão bovino (10-15µm de espessura) contendo extrato hidroalcolólico de própolis vermelha a 0,1%. Posteriormente, foram realizadas feridas de 1cm² no dorso de 30 ratos *Wistar*, que foram distribuídos em seis grupos (n=5): G1 – animais sem tratamento sacrificados em 7 dias; G2 – animais tratados com membrana de colágeno sacrificados em 7 dias; G3 – animais tratados com membrana de colágeno contendo própolis vermelha sacrificados em 7 dias; G4 – animais sem tratamento sacrificados em 14 dias; G5 – animais tratados com membrana de colágeno sacrificados em 14 dias; G6 – animais tratados com membrana de colágeno contendo própolis vermelha sacrificados em 14 dias. Os espécimes removidos foram fixados, processados histologicamente e emblocados em parafina e secções histológicas foram coradas em Azul de toluidina. Ao sétimo dia, a população média de mastócitos total e marginal em G1 mostrou-se significativamente menor que em G2 e G3 (p<0,05), mas não houve diferença entre os dois últimos. Ao décimo quarto dia não foi observada diferença estatisticamente significativa entre o G4, G5 e G6 nem na média total de mastócitos, nem nas duas regiões estudadas separadamente. Sugere-se que, em ratos, o uso de membranas bioativas de colágeno, independente de conter ou não própolis vermelha sob a forma de extrato hidroalcolólico a 0,1%, pode reduzir a desgranulação de mastócitos aos sete dias de cicatrização de feridas abertas, mas não influencia a população desta célula imunocompetente nas fases finais (14 dias) do reparo.

Palavras-chave: inflamação, mastócitos, própolis vermelha.

⁽¹⁾ Mestrando em Saúde e Ambiente. Universidade Tiradentes, Aracaju, SE.

⁽²⁾ Bolsista de Iniciação Científica (PIBIC/CNPq). Curso de Odontologia, Universidade Tiradentes, Aracaju, SE.

⁽³⁾ Professor do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Ambiente, Universidade Tiradentes, Aracaju, SE.

⁽⁴⁾ Laboratório de Morfologia e Biologia Estrutural. Instituto de Tecnologia e Pesquisa, Aracaju, SE.

⁽⁵⁾ Laboratório de Produtos Naturais e Sintéticos. Instituto de Tecnologia e Pesquisa, Aracaju, SE.

Abstract

Mast cells are mesenchymal cells responsible for the initial events of the inflammatory reaction as well as its chronification, and play an important role in wound healing dynamics. The use of natural or synthetic biological membranes in the healing of extensive dermal wounds, for its turn, has been largely discussed in the literature, particularly those collagen-based ones, due to the biocompatibility and interactivity of these materials. Propolis is a natural product that presents anti-inflammatory properties, so that it could be useful to improve wound healing. The red variety of propolis, however, is still less studied, although there has been reported a possible cicatrizing activity. Thus, this study aimed at analyzing the effect of associating collagen membranes to red propolis on the mast cells population during second-intention wound healing in rodents. So, bovine tendon-extracted collagen I membranes were prepared (10-15 μ m thick) containing 0,1%hydroalcoholic extract of red propolis. Subsequently, 1cm² standard-sized wounds were performed in the back of 30 Wistar rats, divided into six groups (n=5): G1- untreated animals sacrificed after 7 days; G2- membrane-treated animals sacrificed after 7 days; G3- membrane/propolis-treated animals sacrificed after 7 days; G4- untreated animals sacrificed after 14 days; G5- - membrane -treated animals sacrificed after 7 days; and G6- - membrane/propolis-treated animals sacrificed after 7 days. The specimens removed were formalin-fixed and paraffin-embedded, and then histological sections were obtained and stained in blue toluidin. At the seventh day, total and marginal mast cells populations in G1 was significantly lesser than in G2 and G3 (P<0,05), but no difference was observed between these last two groups. At the fourteenth day, it was not verified any statistically significant difference in the mean of mast cells among the three groups. These data suggest that, in rodent model, the use of bioactive collagen membranes, containing or not 0,1% hydroalcoholic extracts of red propolis, can reduce the degranulation of mast cells at the seventh day of open wounds cicatrization, but no influence seems to be played in final phases of the cicatricial repair (14 days).

Key-words : inflammation, mast cells, red propolis.

Agradecimentos

Gostaríamos agradecer ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pelo apoio financeiro a esta pesquisa.

Introdução

A resposta inflamatória corresponde a uma reação dos tecidos vascularizados a agentes agressores, caracterizados morfológicamente pela saída de líquidos e de células do sangue para o interstício, e resulta em alterações teciduais classificadas como aguda e crônica. A inflamação aguda é a resposta imediata e precoce caracterizada por emigração de leucócitos em grande quantidade, predominantemente de neutrófilos, cujas principais manifestações clínicas são rubor, calor, dor e edema. A inflamação crônica, por sua vez, é considerada de duração prolongada – semanas ou meses - e tem como uma das principais características a lesão tecidual continuada, com infiltrações de células como macrófagos, linfócitos, plasmócitos (DIEGELMAN, EVANS, 2004).

A resposta inflamatória está estreitamente interligada ao processo de reparação tecidual e serve para destruir, diluir ou encerrar o agente agressor; por sua vez, põe em movimento uma série de eventos que, tanto quanto possível, cicatrizam e reconstituem o tecido danificado. Contudo, a inflamação e a reparação, quando não bem-coordenadas, são potencialmente lesivas (NETTO *et al.*, 2007).

Os mastócitos são elementos normais da população celular do tecido conectivo fibrilar. Localizam-se primariamente em superfícies cutâneas e em mucosas, próximos a vasos sanguíneos, linfáticos e filetes nervosos (YONG, 1997). No seu citoplasma, armazenam mediadores químicos incluindo aminas vasoativas como a histamina, enzimas, proteoglicanos estruturais como a heparina e citocinas. Quando ativados, os mastócitos aumentam em número, tamanho e granulosidade (BEZERRA *et al.*, 2003). Estas células são responsáveis pelo desencadeamento de uma série de fenômenos fisiopatológicos envolvidos na iniciação, manutenção e amplificação da resposta inflamatória, tais como indução de vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular e ativação, expansão clonal e migração de células T CD4⁺ (METCALFE, BARAM e MEKORI, 1997). Desta forma, a relação da população de mastócitos, inflamação e reparo tem sido extensivamente pesquisada na literatura, especialmente em modelo animal (MUSSED *et al.*, 2003; RIBEIRO, 2006; NETTO *et al.*, 2007).

Existem vários relatos na literatura acerca do uso de produtos naturais, entre eles a própolis, no combate a inflamação e conseqüente melhoria do processo de reparo (CASTALDO, CAPASSO, 2002; SEMENOFF SEGUNDO *et al.*, 2007). Entre os efeitos pró-cicatrizantes das diversas variedades de própolis, destaca-se um provável potencial antiinflamatório (GRÉGIO *et al.*, 2005; RAMOS e MIRANDA, 2007). No entanto, apesar de muitos estudos virem sendo realizados com própolis verde, ainda

são poucos os trabalhos que enfoquem as propriedades biológicas da variedade vermelha da própolis brasileira (TRUSHEVA *et al.*, 2006).

Assim, este trabalho objetivou estudar o efeito do uso de filmes de colágeno contendo própolis vermelha sobre a população de mastócitos durante o processo cicatricial por segunda intenção em ratos.

Material e Métodos

Obtenção dos extratos de própolis

A obtenção dos extratos de própolis foi realizada conforme a metodologia aplicada por PARK *et al.* (1998) modificada por Cordeiro (2007). Foi usado 1g da amostra de própolis, passando por um processo de trituração e homogeneização e em seguida foram adicionados 100 mL de solução hidroalcolica 70%. A extração foi efetuada à temperatura ambiente, por 24 horas. Após a extração, a amostra foi filtrada e o solvente rotaevaporado. O pó obtido foi armazenado em tubo de ensaio estéril com rosca e mantido em refrigerador.

Confecção das membranas de colágeno

O colágeno tipo I foi obtido de tendão bovino através de tratamento com NaCl, ácido acético 0,5 mol/L e pepsina, segundo método descrito por Cardoso (2005).

O extrato seco de própolis foi solubilizado em propilenoglicol 400 (PEG400), o qual serviu como co-solvente, uma vez que a própolis não dissolve em água, e como plastificante. Foi preparada uma solução de PEG400 com concentração de própolis igual a 0,5%.

Para confecção das membranas, foi utilizada uma dispersão aquosa a 1% de polímero (colágeno), 0,2% de plastificante contendo a própolis. A concentração final no filme após evaporação do solvente foi de 20% de plastificante em relação à massa seca do polímero e 0,1% de própolis.

Filmes contendo apenas o polímero e o plastificante também foram preparados. Os filmes foram obtidos através de “Casting process” que consiste em verter a dispersão aquosa do polímero em suportes de polietileno. Estes suportes foram colocados em capela de exaustão e o solvente foi evaporado. Após esta etapa, os filmes foram retirados do suporte, cortados na dimensão de 2x2 cm. A esterilização foi feita utilizando radiação Ultravioleta (raios UV), por um período de 20 minutos.

Procedimentos cirúrgicos e formação de grupos

Para o procedimento cirúrgico foram utilizados um total de 30 ratos machos Wistar (300±50g) mantidos em gaiolas com cama de maravalha, trocadas diariamente, mantidos à temperatura controlada de 22°C, em regime de luz com ciclo claro-escuro de 12h, recebendo água *ad libitum* e dieta padrão Labina® (Purina, São Paulo, Brasil). A confecção das feridas foi realizada sob anestesia geral, com injeção intraperitoneal de Thiopentax a 2,5%. O dorso dos animais foi tricotomizado e a antisepsia foi efetuada com iodopovidona tópica a 1%. Foram então realizadas feridas cirúrgicas padronizadas em 1 cm². A profundidade foi determinada através da penetração da parte ativa da lâmina do bisturi em torno de 5,0mm. Não foi realizada sutura das feridas. Os animais foram então subdivididos nos seguintes grupos (n=5): G1 – animais sem tratamento sacrificados ao sétimo dia; G2 – animais tratados com membrana de colágeno sacrificados ao sétimo dia; G3 – animais tratados com membrana de colágeno contendo própolis vermelha sacrificados ao sétimo dia; G4 – animais sem tratamento sacrificados ao décimo quarto dia; G5 – animais tratados com membrana de colágeno sacrificados ao décimo quarto dia; G6 – animais tratados com membrana de colágeno contendo própolis vermelha sacrificados ao décimo quarto dia. Para o sacrifício, os animais foram submetidos à nova administração de anestésico em quantidade três vezes maior àquela utilizada para anestesia; posteriormente, foi realizada a remoção dos espécimes equivalentes a área cicatricial.

Ressalta-se que, antes da realização dos procedimentos cirúrgicos, o projeto de pesquisa foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da UNIT.

Procedimentos histológicos

Decorrido o período de 24 horas para a fixação, as peças foram seccionadas transversalmente, desidratadas em álcool, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina sob a forma de blocos. Os blocos foram montados no micrótomo e obtidos cortes com 5µm de espessura. De cada animal foi confeccionada uma lâmina, a qual foi submetida à coloração pelo azul de toluidina a 0,2%, de acordo com a fórmula citada por Cavalcanti (1989). Os cortes foram observados em um microscópio de luz ZEISS, AXIOLAB em aumento aproximado de 100X, onde foram contadas as células marcadas em violeta (interpretadas como mastócitos) em toda a área da ferida cirúrgica, envolvendo ainda 5 mm além de suas margens e base.

Análise Estatística

Os dados obtidos foram tabulados e analisados para verificar a possível existência de diferenças significativas entre o número médio de células de mastócitos, conforme o tempo de sacrifício. Utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis para identificação de diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, seguida do teste de Dunn.

Resultados

No presente estudo, os mastócitos foram identificados por sua coloração violeta metacromática, e exibiram, de forma geral, morfologia arredondada e, ocasionalmente, alongada, distribuídos nas margens e na profundidade da zona de reparo, especialmente em posição perivascular e perineural (figura 1). Em todos os casos analisados, os mastócitos mostraram-se mais numerosos nas margens da área de reparo cicatricial que na profundidade (base) (figura 2).

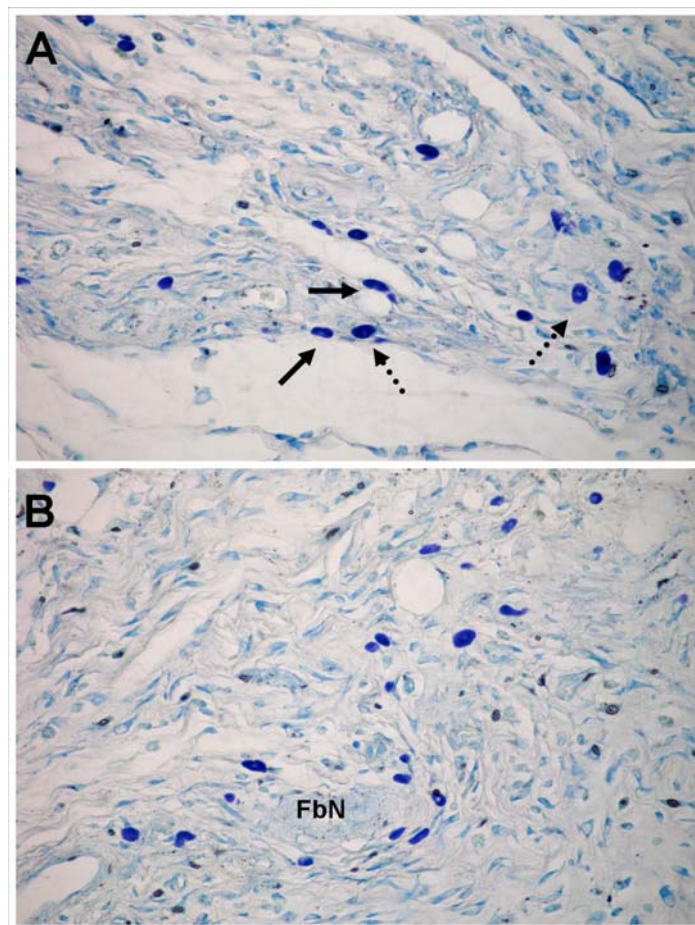


Figura 3. Em (A) observam-se mastócitos metacromáticos (violetas) na profundidade da área de reparo cicatricial (G3) exibindo morfologia ovalada (seta pontilhada) e alongada (seta). Em (B) evidenciam-se mastócitos assumindo disposição periférica a uma fibra nervosa (FbN) (Azul de Toluidina, 100X).

Ao sétimo dia de experimento, a população média de mastócitos nos animais do grupo G1 mostrou-se significativamente menor que nos grupos experimentais G2 e G3 ($p < 0,05$). No entanto, não houve diferença entre os dois últimos. Individualizando as duas regiões da zona de reparo estudadas, verificou-se que, na porção marginal, havia similarmente diferença significativa na média de mastócitos entre G1 e G2 ($p < 0,05$). Ao décimo quarto dia, por sua vez, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle (G4) e os grupos experimentais G5 e G6 nem na média total de mastócitos, nem nas duas regiões estudadas separadamente. Adicionalmente, os grupos experimentais também não mostraram diferenças significativas quando comparados entre si (tabela 1).

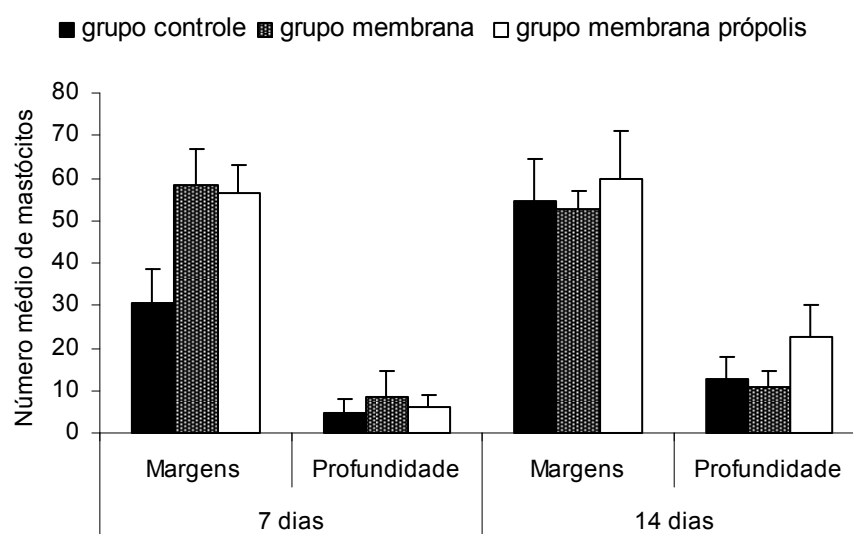


Figura 2. Distribuição dos valores médios da população de mastócitos entre os grupos estudados, mostrando que tanto em 7 quanto 14 dias, havia predomínio destas células nas margens da área de reparo cicatricial, independente do tratamento adotado.

Tabela 1. Distribuição dos valores médios de mastócitos nas margens e profundidade da área de reparo cicatricial nos diversos grupos sacrificados ao sétimo e décimo quarto dias após os procedimentos cirúrgicos.

Grupos	Margens	Profundidade	Total	
7 dias	G1	30,4±8,23 ^{a,b,e}	4,8±7,1	34,9±9,43 ^{c,d}
	G2	58,25±8,42 ^a	8,5±6,13	68,25±12,81 ^c
	G3	56,29±6,7 ^b	6,0±2,82	62,25±8,05 ^d
14 dias	G4	54,8±9,46 ^e	12,49±5,62	65,1±12,88
	G5	52,5±9,43	11,0±3,55	63,5±5,56
	G6	59,65±11,29	22,75±11,22	82,4±14,85

Legenda (comparação entre grupos onde $p < 0,05$):

(^a) $p = 0,044$; (^b) $p = 0,049$; (^c) $p = 0,031$; (^d) $p = 0,047$; (^e) $p = 0,039$

Discussão

Tem sido cada vez mais crescente o número de investigações sobre a importância dos mastócitos em diversos processos fisiopatológicos, especialmente a cicatrização (CAVALCANTI, 1989; NETTO *et al.*, 2007). Numerosos modelos experimentais vêm sendo desenvolvidos a fim de estudar as múltiplas funções dos mastócitos *in vivo* (GALLI, 2000) e *in vitro* (METCALFE, BARAM e MEKORI, 1997), muitas vezes com emprego de técnicas avançadas (KIRSHENBAUM *et al.*, 2000).

Os eventos iniciais do processo de reparo estão voltados para o recrutamento em massa de leucócitos fagócitos, especialmente macrófagos, para o sítio de injúria. Este fenômeno é decorrente, entre outros tantos fatores, da ação de mediadores oriundos da desgranulação de mastócitos, o que faz com que esta população celular apresente grande relevância na fase inflamatória da cicatrização (BALBINO, PEDREIRA e CURI, 2005).

Contudo, a despeito da reconhecida importância dos mastócitos durante as fases mais precoces da cicatrização (fase inflamatória), tem sido sugerido que, em processos cicatriciais por segunda intenção, pode haver persistência da fase aguda por até uma semana, sugerindo manutenção de atividade quimiotática neste período (RIBEIRO, 2006). Posto que os mastócitos sejam células relacionadas com a iniciação, a manutenção e a amplificação da resposta inflamatória e, quando ativados, liberam, por desgranulação, potentes mediadores, que são capazes de induzir a vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular (LOGAN, ODEMUYIWA, MOQBEL, 2003), especula-se a possibilidade de desempenharem algum papel na dinâmica desta persistência.

A população de mastócitos de ratos pode sofrer alterações numéricas em função do ciclo circadiano, mostrando, assim, sua importância quando se deseja estudar as atividades funcionais destas células. O significado da distribuição dos mastócitos nos compartimentos teciduais está relacionado com o potencial que os mediadores químicos possuem de influenciar as células circunvizinhas, com efeitos tóxicos, estimulador ou inibidor. Utiliza-se o termo desgranulação para se caracterizar a secreção de proteínas dos grânulos ou vesículas intracelulares pelos mastócitos (LIMA *et al.*, 2005).

Diversos trabalhos são encontrados na literatura demonstrando os efeitos de variados agentes de natureza física e química sobre a população de mastócitos (CAVALCANTI, 1989; BEZERRA *et al.*, 2003; LIMA, 1995). No entanto, nenhuma pesquisa foi encontrada na literatura até o presente momento, a respeito dos efeitos

da associação entre filmes bioativos (membranas) de colágeno contendo extrato de própolis vermelha.

A desgranulação de mastócitos pôde ser facilmente identificada em investigações científicas prévias por meio da técnica histoquímica do azul de toluidina (CAVALCANTI, 1989; NETTO *et al.*, 2007). O presente estudo corrobora estes dados, haja vista que os mastócitos foram bem marcados, e destacados do tecido e células adjacentes, por meio deste método de coloração.

Neste estudo, o número médio de mastócitos foi estatisticamente menor no grupo controle sacrificado 07 dias após os procedimentos de confecções das feridas do que nos grupos experimentais (membrana e membrana/própolis), sugerindo que ambas as formas de tratamento aplicado pareceram influenciar a população destas células.

Tem sido sugerido que o menor número de mastócitos identificados pelo azul de toluidina poderia estar relacionado a maior desgranulação destas células, uma vez que o corante se impregna nos grânulos dessas células (RIBEIRO, 2006). Assim, os resultados do presente estudo parecem sugerir que no grupo controle (G1) pode ter ocorrido persistência de estímulos capazes de promover desgranulação mastocitária. A identificação de infiltração neutrofílica mais intensa neste grupo, quando comparado aos demais (dados não mostrados), parece corroborar este achado.

Por outro lado, não houve diferença significativa entre os grupos experimentais G2 e G3, sugerindo que o uso da membrana de colágeno, e não a própolis vermelha, parece ter sido o fator diferencial na dinâmica da desgranulação mastocitária.

Em virtude de suas propriedades bioativas, o colágeno, sob diversas formas, vem sendo utilizado como adjuvante no reparo de injúrias físico-químicas (BERNALES *et al.*, 2004, CHENGCAN *et al.*, 2006). Além disso, o potencial de interação da matriz de colágeno acelar com células circunjacentes, a ponto de induzir nestas últimas alterações morfo-estruturais, já foi demonstrado na literatura (CHEN *et al.*, 2000; ELLIOTT *et al.*, 2003).

No entanto, apesar de apresentar numerosas características biomodulatórias, não tem sido relatada na literatura qualquer associação entre o colágeno e atividade antiinflamatória (DIELGEMAN, EVANS, 2004), de modo que a estimulação mastocitária reduzida nos grupos tratados com membrana não parece estar associada à composição físico-química do biofilme, mas sim à proteção mecânica da ferida, o que sabidamente reduz a contaminação microbiana e facilita a instalação e completude do reparo cicatricial.

Deve ser destacado que, no presente estudo, a incorporação de extrato hidroalcoólico de própolis vermelha não pode ter influenciado a população de mastócitos, e conseqüente liberação de mediadores vasoativos, ao sétimo dia do experimento. Contudo, estudos prévios demonstram que extratos etanólicos de própolis verde aumentaram a liberação de histamina por mastócitos (FULIANG *et al.*, 2005; ORSI *et al.*, 2005). Dois fatores podem ter contribuído para essa aparente divergência nos resultados. Primeiro, a variedade da própolis usadas nas mencionadas investigações foi a verde, que segundo tem características bastante distintas da variedade vermelha, usada neste experimento (TRUSHEVA *et al.*, 2006). Segundo, o resultado negativo pode ter sido reflexo da baixa concentração testada (apenas 0,1%). Assim, são necessários estudos posteriores comparando as duas variedades de própolis, e em concentrações maiores, para elucidar melhor esta questão.

Ao décimo quarto dia, não houve diferença estatisticamente significativa entre nenhum dos grupos testados. Esses achados vêm corroborar a premissa de que mastócitos são células imunologicamente ativas na fase inflamatória e início da fase proliferativa do reparo, mas não nas fases tardias, onde a quimiotaxia e alterações vasculares cedem espaço para fenômenos de deposição colagênica, contração da ferida e remodelação da cicatriz (BALBINO, PEDREIRA e CURI, 2005; RIBEIRO, 2006).

De especial interesse foi a observação de que os mastócitos, independente do grupo ou do tempo do experimento, acumulavam-se especialmente nas margens da lesão, em detrimento da sua base profunda, e que, de forma geral, se dispunham em “coleções” ou “aglomerados” celulares. Não foram identificados mastócitos na zona ativa de reparação propriamente dita. Essa disposição particular pode refletir o fato de que a ação mediadora mastocitária se dá sobre vasos e nervos residuais periféricos à zona de injúria (DIEGELMAN, EVANS, 2004; BALBINO, PEDREIRA e CURI, 2005), e que talvez esta distribuição arquitetural tenda a se manter mesmo nas fases mais tardias do reparo.

Baseado nos achados deste estudo sugere-se que o uso de membranas bioativas de colágeno, independente de conter ou não própolis vermelha sob a forma de extrato hidroalcoólico a 0,1%, pode reduzir a desgranulação de mastócitos aos sete dias de cicatrização de feridas abertas, mas não influencia a população desta célula imunocompetente nas fases finais (14 dias) do reparo.

Referências

BALBINO, C.A.; PEDREIRA, L.M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 41(1), 2005.

BERNALES, D.M.; CARIDE, F.; LEWIS, A.; MARTIN, L. Membranas de colágeno polimerizado: consideraciones sobre su uso en técnicas de regeneración tissular y ósea guiadas. *Rev Cubana Invest Biomed.*, 23(2) : 65-74, 2004.

BEZERRA, HL; RIZZO, LV; YUY, MCZ; FREITAS, D. Avaliação da resposta terapêutica nas alergias oculares por meio da citologia esfoliativa., *Arq Bras Oftalmol*, 66 : 595-598, 2003.

CARDOSO, J.C., **Modificação do colágeno pela reação de Maillard e avaliação de formulações na forma de gel desenvolvidas a partir do material modificado**. Tese de Doutorado, USP, Ribeirão Preto, Brasil, 2005.

CASTALDO S, CAPASSO F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*, 73: S1-S6, 2002.

CAVALCANTI HG. **Interferência da cortisona sobre a população de mastócitos no processo cicatricial de ratos albinus submetidos à privação crônica de alimentos** Tese Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte, Brasil, 1989.

CHEN, C. S.; OSTUNI, E.; WHITESIDES, G.M.; INGBER, D.E. Using self-assembled monolayers to pattern ECM proteins and cells on substrates *Methods Mol. Biol.*, 139 : 209-219, 2000.

CHENGCAN, Y.; PING, Y.; HAO, W.; ZHENGANG, Z. Acceleration of wound healing in traumatic ulcers by absorbable collagen sponge containing recombinant basic fibroblast growth factor. *Biomed Mater*. 1 (33-37), 2006.

DIEGELMANN, R.F.; EVANS, C.M. Wound healing an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Frontiers in Bioscience*. 9 : 283-289, 2004.

ELLIOTT, J.T.; TONA, A.; WOODWARD, J.T.; JONES, P.L.; PLANT, A.L. Thin Films of Collagen Affect Smooth Muscle Cell Morphology., *Langmuir*, 19(5) : 1506-1514, 2003.

FULIANG, HU; HEPBURN, HR; YINGHUA, L; CHEN, M; RADLOFF, SE; DAYA, S. effects of ethanol and water extracts of própolis (bee glue) on acute inflammatory animal models. *Journal Ethnopharmacology*, 100 : 276-283, 2005.

GALLI, S.J. Mast cells and basophils. *Curr Opin Hematol* 7 : 32–39, 2000.

GRÉGIO, A.M.T.; LIMA, A.A.S.; RIBAS, M.O.; BARBOSA, A.P.M.; PEREIRA, A.C.P.; KOIKE, F; REPEKE, C.E.P. Efeito da Propolis mellifera sobre o processo de reparo de lesões ulceradas na mucosa bucal de ratos. *Estud. Biolog.*, 27(58), 2005.

KIRSHENBAUM, A.S.; SEMERE, T.; WOROBEK, A. S.; SCOTT, L.M. Mastocitosis cutânea. *Exp. Hematol.* 28(19) : 140-147, 2000.

LIMA A.A.S., **Estudo do efeito do hidróxido de cálcio P.A. no processo de reparo e na população de mastócitos do tecido conjuntivo subcutâneo de ratos.** Dissertação de Mestrado, Departamento de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte, Brasil, 1995.

LIMA, A.A.S.; GRÉGIO, A.M.T.; FRANÇA, B.H.S.; MACHADO, M.A.N.; IGNÁCIO, A.S.; CENTURIÓN, M.M. População de mastócitos em ulcerações bucais de ratos tratadas com extrato etanólico de própolis. *Rev. Bras. Patol Oral.*, 4(3) : 2-9, 2005.

LOGAN, M.R.; ODEMUYIWA, S.O.; MOQBEL, R. Understanding exocytosis in immune and inflammatory cells: the molecular basis of mediator secretion. *J Allergy Clin Immunol* 111(5) : 923-932, 2003.

METCALFE, D.D.; BARAM, D; MEKORI, Y.A. Mast Cells. *Physiol Rev*, 77(4) : 1033-1079, 1997.

MUSSED, R.L.O.; SILVA, E.S.; COSTA, A.M.A.; MANDARIM DE LACERDA, C.A. Mast cells in tissue response to dentistry materials: an adhesive resin, a calcium hydroxide and a glass ionomer cemen. *J.Cell.Mol.Med.*, 7(2) : 171-178, 2003.

NETTO, B.D.M.; SCHWEGLER, A.C.; LIMA, A.A.S.; SCUR, E.M. Avaliação de mastócitos da mucosa intestinal inflamada de ratos submetidos à ingestão de ácidos graxos insaturados. *Rev Bras Nutr Clin.*, 22(3) : 230-236, 2007.

ORSI, R. O.; SFORCIN, J. M.; FUNARI, S. R. C.; GOMES, J. C. Effect of propolis extract on guinea pig lung mast cell. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 11(1), 2005.

PARK, Y.K.; IKEGAKI, M.; ABREU, J.A.S.; ALCICIE, N.M.F. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 18(3), 1998.

RAMOS, A.F.N.; MIRANDA, J.L. Propolis: a review of its anti-inflammatory and healing actions. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.*, 13(4) : 698, 2007.

RIBEIRO, MAM. **Avaliação morfológica, histoquímica e imuno-histoquímica do processo de reparo subcutâneo em ratos submetidos à fotobiomodulação a laser 660nm.** Tese de Doutorado, Programa Integrado de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil, 2006.

SEMENOFF SEGUNDO, A.; BOSCO, A.F.; MAIA, D.; RIBEIRO, R.V.; AGUIAR, E.B.H.; ROSCATTO, G.E.G.D.; CIRILO, D.M.; BUZELLE, S.L.; VEDOVE, T.A.D. influência do aloe vera e própolis na contração de feridas em dorso de ratos. *Periodontia*. 17(1) : 5-10, 2007.

TRUSHEVA, B.; POPOVA, M.; BANKOVA, V.; SIMOVA, S.; MARCUCCI, M.C.; MIORIN, P.L.; PASIN, F.R.; TSVETKOVA, I. Bioactive constituents of brazilian red propolis. *Evid Based Complement Alternat Med*, 3 : 249-254, 2006.

YONG, L.C.J. The mast cell: origin, morphology, distribution, and function. *Experimental Toxic Pathology*, 49 : 409-424, 1997.

CAPÍTULO IV
Estudo do padrão de deposição de fibras colágenas
durante a cicatrização de feridas tratadas com
membranas de colágeno contendo própolis vermelha

Estudo do padrão de deposição de fibras colágenas durante a cicatrização de feridas tratadas com membranas de colágeno contendo própolis vermelha.

Study of the pattern of deposition of collagen fibers during the healing of wounds treated with collagen membranes containing red propolis.

André Luiz Santos Barreto¹, Jônatas Almeida Pires², Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior^{3, 4}, Francisco Prado Reis^{3,4}, Juliana Cordeiro Cardoso^{3,5}.

Resumo

A própolis é um produto natural que apresenta diversas atividades biológicas, como ação bactericida, fungicida, antiinflamatória, dentre outras. A variedade vermelha desse produto, contudo, ainda é pouco estudada, existindo alguns relatos de uma provável ação cicatrizante. O uso de membranas biológicas naturais ou sintéticas no reparo de feridas dérmicas extensas, por sua vez, tem sido bastante discutido na literatura, especialmente aquelas à base de colágeno, devido à biocompatibilidade e interatividade desse material. Assim, o objetivo deste trabalho foi analisar o efeito da associação de membranas de colágeno à própolis vermelha sobre o processo de síntese, deposição e arranjo arquitetural da matriz de colágeno durante o reparo cicatricial por segunda intenção. Para tanto, foram preparadas membranas de colágeno I extraído de tendão bovino (10-15µm de espessura) contendo extrato hidroalcoólico de própolis vermelha a 0,1%. Posteriormente, foram realizadas feridas de 1cm² no dorso de 30 ratos *Wistar*, que foram distribuídos em seis grupos (n=5): G1 – animais sem tratamento sacrificados em 7 dias; G2 – animais tratados com membrana de colágeno sacrificados em 7 dias; G3 – animais tratados com membrana de colágeno contendo própolis vermelha sacrificados em 7 dias; G4 – animais sem tratamento sacrificados em 14 dias; G5 – animais tratados com membrana de colágeno sacrificados em 14 dias; G6 – animais tratados com membrana de colágeno contendo própolis vermelha sacrificados em 14 dias. Os espécimes removidos foram fixados, processados histologicamente e emblocados em parafina e secções histológicas foram coradas em HE e picrossírius para análise do padrão de colagenização. Aos 7 dias, observou-se que as fibras colágenas eram predominantemente delgadas e delicadas, sendo mais escassas e consistentes com colágeno tipo III em G1, e mais abundantes e compatíveis com colágeno tipo I imaturo em G2 e G3. Neste último, evidenciou-se forte tendência à disposição paralela e ondulada dos feixes. Aos 14 dias, as fibras mostravam-se mais espessas e grosseiras, embora em G5 a colagenização não fosse homogênea, diminuindo na região mais central da área cicatricial. Os grupos G5 e G6 apresentaram densa deposição de feixes de colágeno I maduro, embora o primeiro exibisse disposição mais paralela dos feixes em contraposição ao padrão levemente entrelaçado do segundo. Os dados obtidos neste estudo sugerem que o uso de membranas de colágeno parece estimular a deposição colagênica, e que sua associação a extratos hidroalcoólicos de própolis vermelha, mesmo em concentrações significativamente baixas, pode atuar como adjuvante importante na síntese, deposição e organização do colágeno dérmico durante a cicatrização de feridas.

Palavras-chave: cicatrização, colagenização, própolis vermelha.

⁽¹⁾ Mestrando em Saúde e Ambiente. Universidade Tiradentes, Aracaju, SE.

⁽²⁾ Bolsista de Iniciação Científica (PIBIC/CNPq). Curso de Odontologia, Universidade Tiradentes, Aracaju, SE.

⁽³⁾ Professor do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Ambiente, Universidade Tiradentes, Aracaju, SE.

⁽⁴⁾ Laboratório de Morfologia e Biologia Estrutural. Instituto de Tecnologia e Pesquisa, Aracaju, SE.

⁽⁵⁾ Laboratório de Produtos Naturais e Sintéticos. Instituto de Tecnologia e Pesquisa, Aracaju, SE.

Abstract

Propolis is a natural substance that presents various biological activities, such as bactericidal, fungicidal, anti-inflammatory actions, and others. Although there are not a lot of studies on the red kind of this product, there are reports of a probable healing action. The use of natural or synthetic biological membranes on extensive dermic wounds in the healing process has been discussed in the literature, especially those collagen-based membranes, due to biocompatibility and interaction of this material. Therefore, the aim of this study was to analyze the effect of the association of collagen membranes to red propolis on the synthesis process, deposition, and architectural arrangement of collagen matrix during the second intention wound healing. For such, collagen I membranes extracted from bovine tendon were prepared (10-15µm of thickness) containing hydroalcoholic extract of 0,1% red propolis. Afterwards, wounds of 1cm² were done in the dorsum of 30 *Wistar* rats, that were distributed in six groups (n=5): G1 – animals with no treatment were sacrificed in 7 days; G2 – animals treated with collagen membranes sacrificed in 7 days; G3 – animals treated with collagen membrane containing red propolis sacrificed in 7 days; G4 – animals with no treatment sacrificed in 14 days; G5 – animals treated with collagen membrane sacrificed in 14 days; G6 – animals treated with collagen membrane containing red propolis sacrificed in 14 days. The specimen removed were formalin fixed, and buffing embedded and histological sections were dyed in HE and pricosirius red to analyze the collagen deposition pattern. At the seventh day, it was observed thin and delicate collagen fibers, and presented scarce and consistent with type III collagen in G1, but abundant and compatible with immature type I collagen in G2 and G3. In the latter, it was verified a strong tendency to assume a wavy parallel disposition of the bundles. After fourteen days, the fibers shoed to be thicker and grosser, although the collagenization had not been homogeneous in G4, since it was less conspicuous in the center of the healed wounds. G5 and G6 presented dense depositions of mature type I collagen fibers, even though the first group had exhibited a more parallel disposition of the bundles in opposition to the slightly entwined pattern seen in the second. The data obtained in this study suggested that the use of collagen membranes seems to stimulate collagen deposition, and that their association to hydroalcoholic extracts of red propolis, even in low concentrations, might play an important adjuvant role in the synthesis, deposition and organization of the dermal collagen during wound healing.

Key-words: wound healing, collagenization, red própolis.

Agradecimentos

Gostaríamos de agradecer ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pelo apoio financeiro, e a Profa. Dra. Vera Feitosa, Chefe do Departamento de Morfologia da Universidade Federal de Sergipe (UFS), pela imensa solicitude quando da realização das fotomicrografias sob luz polarizada.

Introdução

A cicatrização de feridas é um fenômeno altamente complexo caracterizado pelo desencadeamento de uma seqüência de eventos interdependentes e sobrepostos descritos como fase exsudativa (inflamatória), proliferativa e de maturação (remodelação). (MARTINS *et al.*, 2006).

O tipo de ferida é um fator de primordial importância para a cicatrização (MANDELBAUM, SANTIS, MANDELBAUM, 2003). Quando há possibilidade de coaptação das bordas da ferida e perda inconspícua de substância a cicatrização é rápida e a cicatriz é praticamente imperceptível (cicatrização por primeira intenção). Quando ocorre perda de substância significativa, a cicatrização se processa mais lentamente (cicatrização por segunda intenção), pois se faz necessária a formação da reação de granulação, rica em elementos vasculares e celulares, que vai se alastrando paulatinamente, preenchendo o vazio resultante dos tecidos perdidos. À medida que se formam novas camadas de reação de granulação, as mais antigas, profundamente situadas, vão perdendo sua riqueza em vasos, e os fibroblastos e feixes de colágeno passam a predominar (BALBINO, PEDREIRA e CURI, 2005).

A produção de colágeno (colagenização) da área de perda de substância que ocorre durante o processo de cicatrização por segunda intenção representa um dos fatores mais significativos para a recuperação dérmica após uma agressão (DIELGEMAN, EVANS, 2004). O colágeno constitui, em verdade, um grupo de proteínas compostas por três cadeias polipeptídicas dispostas em tripla hélice, e é o principal componente da matriz extracelular (MEC) perfazendo aproximadamente 25% da massa protéica total do organismo (GHADIALLY, 1997). As fibras colágenas, de modo geral, se dispõem num padrão ondulado e exibem extensão bastante variada, e têm papel fundamental na arquitetura tecidual, na resistência dos tecidos e em uma ampla variedade de interações célula-célula e célula-matriz (RICH, WHITTAKER, 2005).

O colágeno pode ser classificado em dois tipos principais: os colágenos formadores de fibrila e os não – fibrilares (JUNQUEIRA *et al.*, 1983). As fibrilas colagenosas da derme representam híbridos de subclasses bioquímicas distintas de colágenos denominados tipo I, II e III. O colágeno I é o mais abundante, ocorrendo em uma variedade de tecidos, fornecendo alta resistência à tensão da pele, tendões e ligamentos; o colágeno tipo II predomina em cartilagens hialinas e elásticas; e o colágeno tipo III está presente em virtualmente todos os tecidos conjuntivos em

proporção variada ao colágeno tipo I. Os não- fibrilares formam um grupo heterogêneo que inclui os colágenos das membranas basais (tipo IV) (LINSENMAYER, 1991). Além disso, deve ser destacado que a disposição arquitetural típica das moléculas de colágeno em feixes fibrosos é altamente relevante para geração de força tênsil em um tecido exposto à agressão (PUGLIESE *et al.*, 2003).

Durante a dinâmica cicatricial, a síntese de colágeno inicia-se ao terceiro dia, atinge seu pico máximo em três a seis semanas e entra em fase de remodelação. O colágeno tipo III é inicialmente sintetizado e depositado, sendo gradativamente substituído por colágeno tipo I à medida que ocorre maturação do tecido cicatricial (CARNEIRO *et al.*, 2005).

O uso da solução de Picrosirius Red examinada à microscopia polarizada apresenta marcante sensibilidade e especificidade para localizar as fibras colágenas (FONSECA, 2003). Podem-se distinguir em padrões de cores, diferenças de diâmetro e arranjo estrutural das fibras do colágeno, diferentes tipos de colágenos (HIRSHBERG, BUCHNER e DAYAN, 1996; HIRSHBERG, BUCHNER e DAYAN, 1999): o colágeno Tipo I se compõe de fibras espessas amarelas brilhantes, laranja ou vermelha; o Tipo II se apresenta como fibras finas com cores variadas distintas das observadas no colágeno I; o Tipo III está representado por fibras extremamente delgadas esverdeadas e amarelo-esverdeadas. Tem sido sugerido que as diferentes birrefringências observadas à polarização após o uso do Picrosirius Red, permitem avaliar a fase do processo cicatricial, onde o colágeno encontra-se esverdeado ou amarelo esverdeado, em fase de cicatrização e altamente birrefringentes de cor laranja ou vermelha em processo fibrótico inativo. Assim, este método mostra-se bastante apropriado para avaliação da quantidade de deposição de colágeno em estudos que visam à avaliação da cicatrização (RABAU, DAYAN, 1994; RIBEIRO *et al.*, 2004).

Contudo, diversos fatores podem modular a síntese de colágeno e interferir na velocidade de deposição da matriz protéica, na sua maturação ou em seu arranjo organizacional durante o processo cicatricial (MANDELBAUM, SANTIS, MANDELBAUM, 2003). Entre as estratégias utilizadas recentemente para modular o processo cicatricial, destaca-se o uso de membranas bioativas. As membranas contendo colágeno tem sido um dos materiais mais utilizados para reparar danos a traumas químicos e mecânicos, em especial em mucosas, devido a sua biocompatibilidade e sua capacidade para promover cicatrização de feridas (YAMATOOGI *et al.*, 2005). Além disso, foi demonstrado que matrizes de colágeno estimulam a proliferação de miofibroblastos sendo este um dos fatores primordiais para o reparo tecidual (HELARY *et al.*, 2006).

Têm sido demonstrados na literatura dados bastante promissores quanto ao uso de soluções hidroalcoólicas de própolis em soluções de continuidade do derma como estratégia de promover melhorias no processo de reparo (SEMENOFF SEGUNDO *et al.*, 2007). A atividade biológica da própolis parece estar relacionada à sua ação antimicrobiana, anti-inflamatória e imunomodulatória (CASTALDO, CAPASSO, 2002). No entanto, poucos estudos enfocam o efeito deste produto natural sobre o processo de reparo por segunda intenção, especialmente a variedade vermelha sergipana da própolis.

Neste contexto, alguns estudos têm se concentrado em promover a incorporação de compostos bioativos (fármacos sintéticos ou produtos naturais) em biomateriais implantáveis, a exemplo das membranas de colágeno I, especialmente em virtude das vantagens relacionadas a uma aceleração do processo de granulação e epitelização e a liberação controlada do produto incorporado diretamente no tecido danificado (HELARY *et al.*, 2006). Assim, constituiu proposição do presente trabalho analisar o efeito da associação de membranas bioativas de colágeno I à própolis vermelha sobre o processo de síntese, deposição e arranjo arquitetural da matriz de colágeno durante o reparo cicatricial por segunda intenção.

Material e Métodos

A obtenção dos extratos de própolis foi realizada conforme a metodologia aplicada por PARK *et al.* (1998) modificada. Foi usado 1g da amostra de própolis, passando por um processo de trituração e homogeneização e em seguida foram adicionados 100 mL de solução hidroalcoólica 70%. A extração foi efetuada à temperatura ambiente por 24 horas. Após a extração, a amostra foi filtrada e o solvente rotaevaporado. O pó obtido foi armazenado em tubo de ensaio estéril com rosca e mantido em refrigerador.

O colágeno tipo I foi obtido de tendão bovino através de tratamento com NaCl, ácido acético 0,5 mol/L e pepsina, segundo método descrito por Cardoso (2005). O material foi tratado inicialmente com acetona (desengordurante) e com NaCl e tampão citrato para intumescimento das fibras, seguido da eliminação do telopeptídeo (fração imunogênica) utilizando para tanto pepsina em meio ácido (ácido acético). O gel formado foi submetido a um aumento de força iônica (NaCl 5%) para precipitação das fibras e conseqüente purificação. O material foi lavado e dialisado até total remoção dos sais.

O extrato seco de própolis foi solubilizado em propilenoglicol 400 (PEG400), o qual serviu como co-solvente, uma vez que a própolis não dissolve em água, e como plastificante. Foi preparada uma solução de PEG400 com concentração de própolis igual a 0,5%.

Para confecção das membranas, foi utilizada uma dispersão aquosa a 1% de polímero (colágeno), 0,2% de plastificante contendo a própolis. A concentração final no filme após evaporação do solvente foi de 20% de plastificante em relação à massa seca do polímero e 0,1% de própolis.

Filmes contendo apenas o polímero e o plastificante também foram preparados. Os filmes foram obtidos através de “Casting process” que consiste em verter a dispersão aquosa do polímero em suportes de polietileno. Estes suportes foram colocados em capela de exaustão e o solvente foi evaporado. Após esta etapa, os filmes foram retirados do suporte, cortados na dimensão de 2x2 cm. A esterilização foi feita utilizando radiação Ultravioleta por um período de 20 minutos.

Para o procedimento cirúrgico foram utilizados um total de 30 ratos machos Wistar (300±50g) mantidos em gaiolas com cama de maravalha, trocadas diariamente, mantidos à temperatura controlada de 22°C, em regime de luz com ciclo claro-escuro de 12h, recebendo água *ad libitum* e dieta padrão Labina® (Purina, São Paulo, Brasil). A confecção das feridas foi realizada sob anestesia geral, com injeção intraperitoneal de Thiopentax (tiopental sódico) a 2,5%. O dorso dos animais foi tricotomizado e a antissepsia foi efetuada com iodopovidona tópico a 1%. Foram então realizadas feridas cirúrgicas padronizadas em 1 cm². A profundidade foi determinada através da penetração da parte ativa da lâmina do bisturi em torno de 5,0mm. Não foi realizada sutura das feridas. Os animais foram então subdivididos nos seguintes grupos (n=5): G1 – animais sem tratamento sacrificados ao sétimo dia; G2 – animais tratados com membrana de colágeno sacrificados ao sétimo dia; G3 – animais tratados com membrana de colágeno contendo própolis vermelha sacrificados ao sétimo dia; G4 – animais sem tratamento sacrificados ao décimo quarto dia; G5 – animais tratados com membrana de colágeno sacrificados ao décimo quarto dia; G6 – animais tratados com membrana de colágeno contendo própolis vermelha sacrificados ao décimo quarto dia.

Para o sacrifício, os animais foram submetidos à nova administração de anestésico em quantidade três vezes maior àquela utilizada para anestesia; posteriormente, foi realizada a remoção dos espécimes equivalentes à área cicatricial. O material excisado foi fixado em formol, processado de acordo com técnicas histológicas de rotina e embocado em parafina. Secções histológicas de 5µm foram obtidas e submetidas à coloração Hematoxilina/Eosina (HE) e Picrosirius Red para

estudo da deposição colagênica. A primeira coloração foi analisada em microscopia de luz convencional, e a segunda sob luz polarizada.

Foi realizada a análise descritiva dos seis grupos, detendo-se na identificação do colágeno, classificação em tipo I ou III de acordo com a birrefringência apresentada, observação do aspecto morfológico das fibras (estiradas ou onduladas, delgadas ou espessas, curtas ou longas) e disposição dos feixes (entrelaçados ou paralelos), tanto na porção superficial quanto profunda da ferida.

Resultados

Ao sétimo dia, G1 demonstrava ausência de atividade fibroprodutiva na superfície do ferimento em função de manutenção de infiltração polimorfonuclear, e reação de granulação exuberante na profundidade do espécime, ainda numa fase predominantemente vâsculo-endotelial, com patente escassez de fibras colágenas visíveis ao HE. Os demais grupos apresentavam feixes de fibras eosinofílicas delicados e delgados de colágeno, que se mostravam mais aparentes em G3 que em G2 (figura 1).

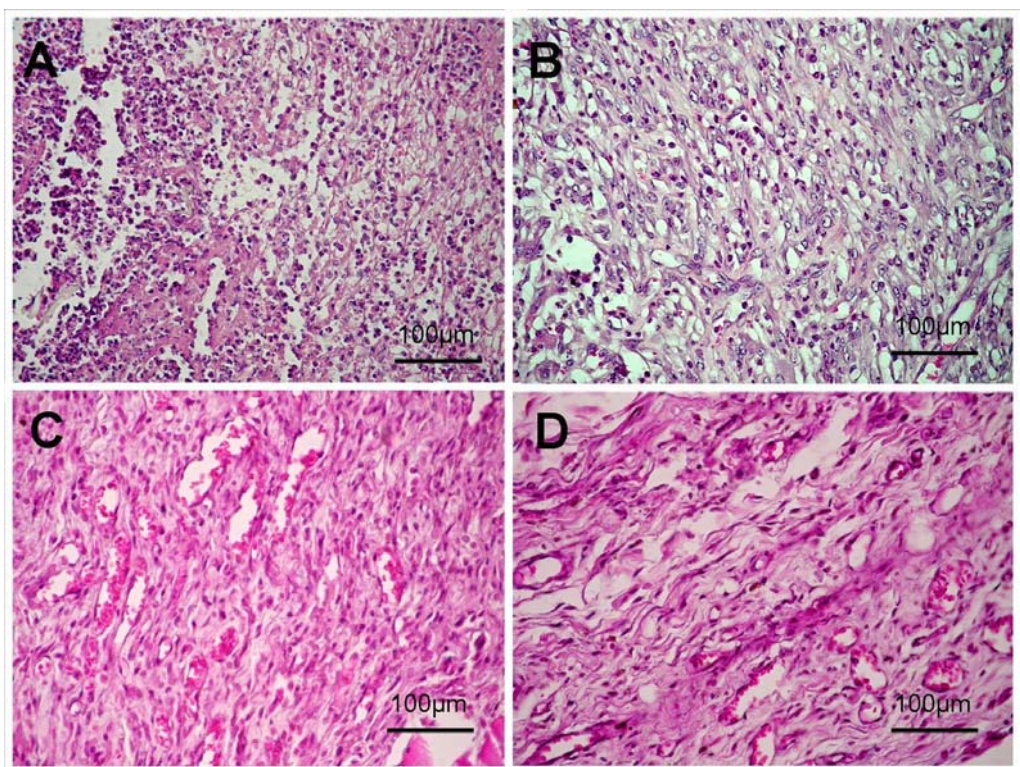


Figura 5. Grupo G1 apresenta escassa colagenização na superfície (A) e profundidade (B), enquanto G2 (C) e G3 (D) exibem feixes eosinofílicos delgados e delicados de colágeno, um pouco mais aparentes no último grupo (HE, 200x).

As secções coradas em Picrossírius Red examinadas sob luz polarizada revelaram, em G1, a presença de feixes fibrosos de comprimento variável, predominantemente curtos, delgados e delicados, e de aparência discretamente ondulada, com disposição irregular e birrefringência esverdeada e amarelo-esverdeada, amplamente consistentes com deposição de colágeno imaturo (tipo III). Evidenciou-se, ainda, grande quantidade de espaços interfibrilares. De especial interesse foi à observação de que os feixes mais esverdeados predominavam na superfície do espécime, enquanto os amarelo-esverdeados eram mais abundantes na profundidade. Em G2, por sua vez, os feixes se mostravam mais longos, com tendência à disposição paralela à superfície da ferida, ora estirados ora ondulados, e exibindo birrefringência de coloração variada, predominando fibras amarelas e amarelo-alaranjadas (colágeno tipo I imaturo); na profundidade dos espécimes, todavia, evidenciavam-se algumas fibras de coloração avermelhada, compatíveis com colágeno I maduro. Embora menos aparentes que em G1, os espaços interfibrilares ainda eram abundantes. No grupo G3, contudo, os feixes fibrosos amarelo-alaranjados eram os mais abundantes, e pareciam mais espessos e regulares. A disposição arquitetural do colágeno era, de modo geral, claramente paralela, mas estes pareciam se organizar de maneira singular, quase em um padrão concêntrico, ao redor dos pequenos vasos sanguíneos que formavam a rica rede capilar neste grupo. Esta combinação de padrões de distribuição do colágeno por vezes conferia um aspecto levemente entrelaçado à disposição dos feixes fibrosos. Adicionalmente, os espaços interfibrilares eram francamente menos conspícuos neste grupo que nos anteriores (figura 2).

Ao décimo quarto dia o grupo controle (G4) mostrava, ao HE, a presença de feixes fibrosos eosinofílicos bastante delicados, com aparência ondulada e disposição paralela à superfície da ferida. O grupo tratado com membrana (G5) exibia aspecto semelhante, embora os feixes parecessem um pouco menos ondulados e as fibras fossem ligeiramente mais aparentes. No grupo onde foram usadas membranas contendo própolis vermelha (G6), por sua vez, a colagenização pareceu mais abundante, com fibras mais espessas e padrão arquitetural de disposição paralela dos feixes, embora se observasse discreta tendência ao entrelaçamento (figura 3).

As secções histológicas coradas pelo Picrossírius, analisadas sob luz polarizada, revelaram mais detalhes da colagenização nos animais sacrificados ao décimo quarto dia. Nos três grupos predominavam feixes fibrosos com birrefringência amarelo-alaranjado (colágeno tipo I), enquanto que as estruturas fibrilares esverdeadas ou amarelo-esverdeadas (colágeno tipo III) se mostravam escassas e, quando aparentes, delgadas e delicadas.

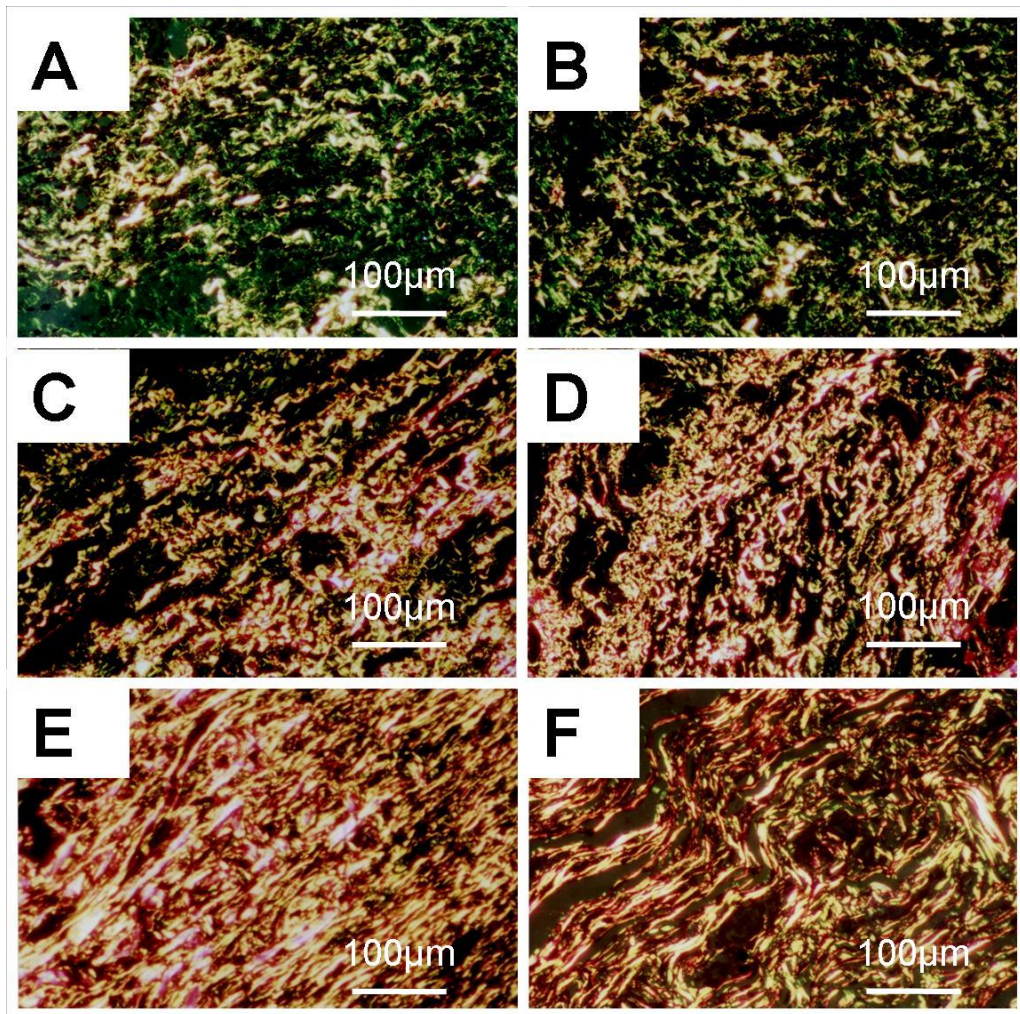


Figura 6. Sob luz polarizada, G1 exibe escassos feixes fibrosos curtos, esverdeados e amarelo-esverdeados (colágeno tipo III), com abundância de espaços interfibrilares (A e B). Em G2 (C e D) os feixes se apresentam mais longos, com algumas fibras já exibindo birrefringência amarelo-alanjado e avermelhada (colágeno tipo I imaturo). Em G3, observam-se feixes fibrosos mais densos e espessos, com disposição paralela bem estruturada (E) e, por vezes, circundando vasos sanguíneos (F) (Picrossírius, 200x)

Observou-se que, em G4, as fibras colágenas ainda se apresentavam curtas, levemente onduladas e com disposição paralela. Destaca-se que, em 03 casos, a região superficial mais central da área de cicatrização ainda não havia sido totalmente preenchida por colágeno tipo I (figura 4A e B). Em G5, embora a maior parte dos feixes colagênicos exibissem birrefringência amarelo-alaranjada com disposição paralela e ondulada característicos do colágeno tipo I recém-depositado (figura 4C), já era observada a deposição de estruturas fibrilares delgadas de coloração avermelhada, sugerindo um colágeno tipo I mais maduro. Destaca-se, ainda, que estas últimas fibrilas se dispunham em várias direções, mais a organização paralela à superfície era predominante (figura 4D). A disposição de fibras colágenas amarelo-

alaranjadas em G6 era, de forma geral, bastante semelhante a G5, embora houvesse menor quantidade de espaços interfibrilares no primeiro. Além disso, os feixes fibrilares com birrefringência avermelhada se mostravam bem mais abundantes, e sua disposição arquitetural variada, muitas vezes perpendicular à superfície, emprestava ao quadro histológico uma aparência levemente entrelaçada, que contrastava com o aspecto paralelo dos feixes fibrosos observados nos demais grupos.

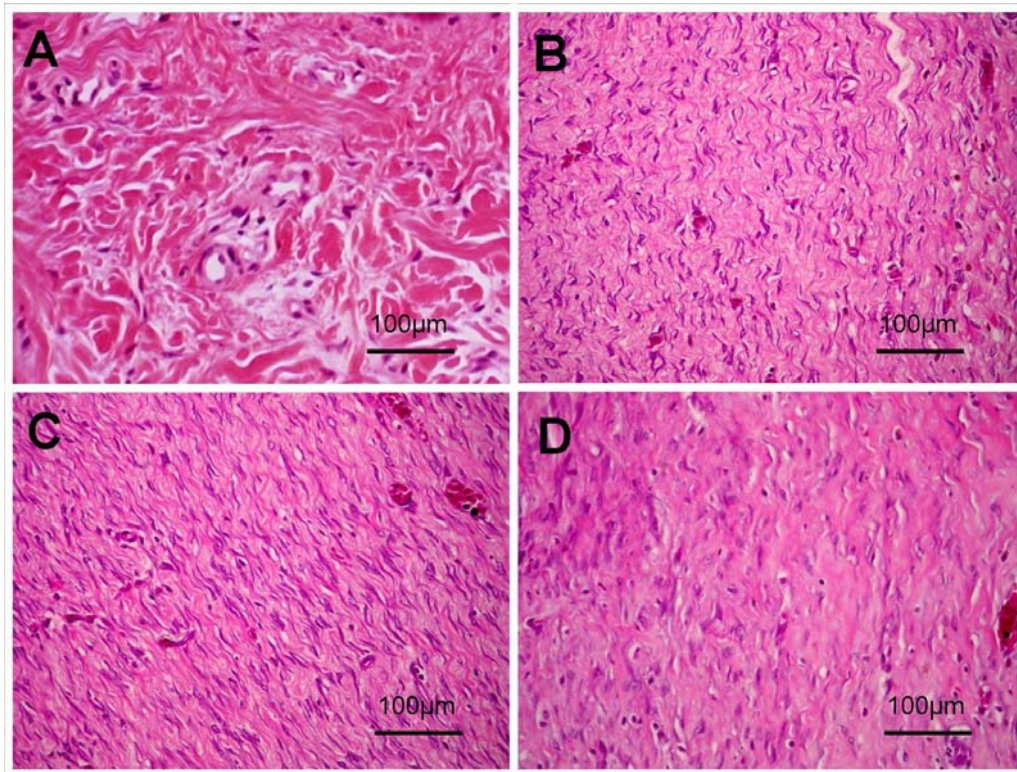


Figura 7. Região profunda da derma normal exibindo feixes espessos, grosseiros e entrelaçados de fibras colágenas (A.) Em G4 e G5, o colágeno neoformado é aparentemente delicado e ondulado (B e C, respectivamente), embora os feixes pareçam mais aparentes no último grupo. Já em G6 (D), os feixes fibrosos se apresentam um pouco mais espessos (HE, 200x).

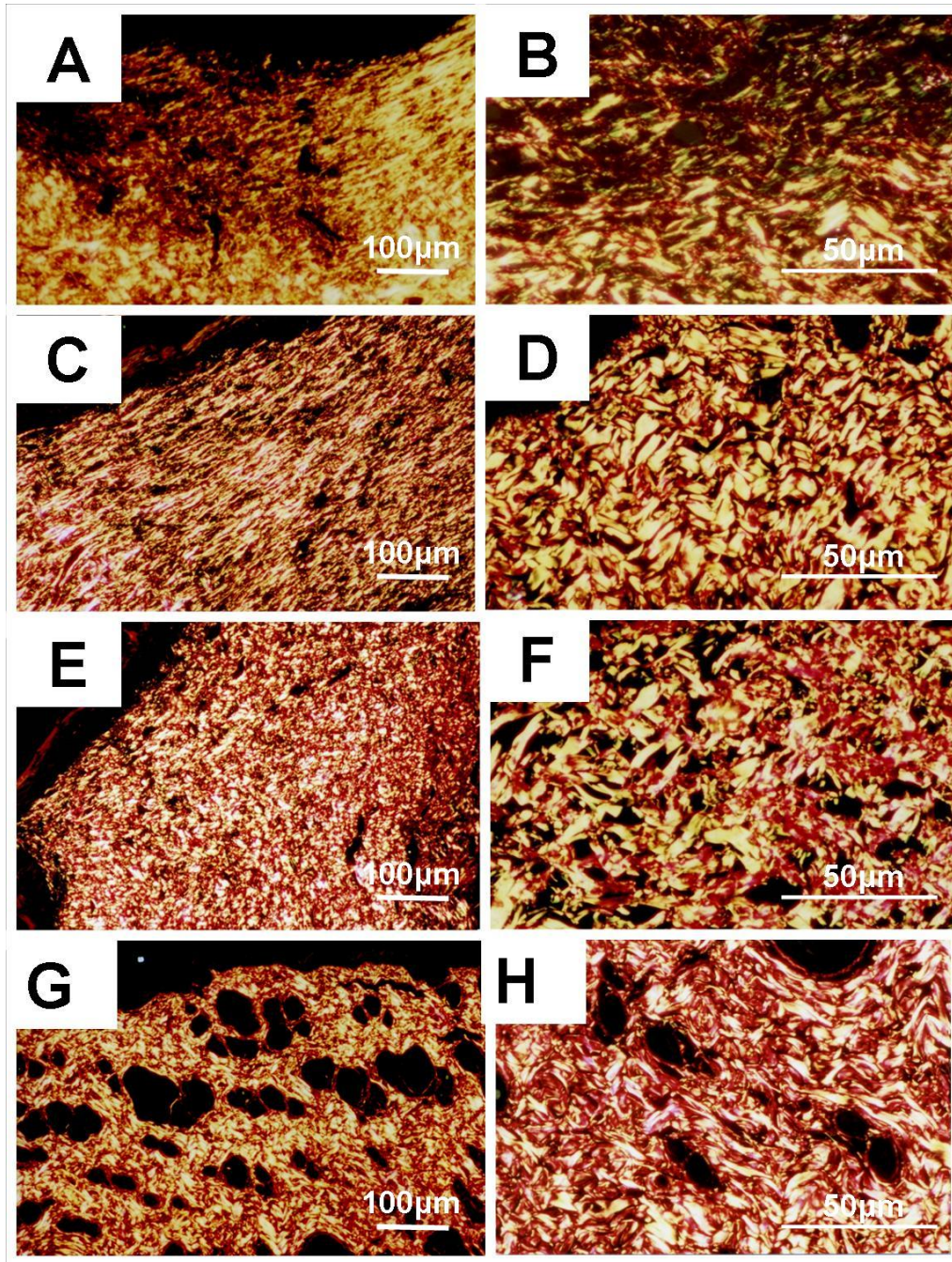


Figura 8. Fotomicrografias dos espécimes corados em picrossírius, observados sob luz polarizada. Grupo controle (G4) exibindo feixes colagênicos paralelos, com birrefringência amarelo-alaranjadas, que se apresentavam mais escassas na região superficial central (A) (100x). Detalhe da figura anterior mostrando a persistência de fibrilas esverdeadas delgadas na zona de retardo do reparo (B) (200x). O Grupo G5 mostra reparação colagênica composta por feixes amarelados e espessos e feixes avermelhados delicados, com disposição predominantemente paralela à superfície da área cicatricial (C, 100x; D, 200x). No grupo G6, os espaços interfibrilares são menos conspícuos, as fibrilas avermelhadas mais abundantes e o padrão arquitetural levemente entrelaçado (E, 100x; F, 200x). As fotomicrografias G (100x) e H (200x) mostram a derme normal, para comparação.

Discussão

A cicatrização é um evento biológico complexo, envolvendo inflamação, quimiotaxia, proliferação celular, colagenização e remodelação (MANDELBAUM, SANTIS, MANDELBAUM, 2003). A colagenização, por sua vez, representa um fator de suma importância durante o processo de cicatrização por segunda intenção, uma vez que o colágeno é o principal componente dérmico responsável pelo restabelecimento da pele após injúria (DIELGEMAN, EVANS, 2004). Infere-se, pois, que o estudo do padrão de deposição colagênica pode oferecer subsídios de extrema relevância para o entendimento do processo cicatricial. Neste contexto, o uso de colorações especiais específicas para colágeno, a exemplo do Picrossírius, se reveste de grande relevância para seu estudo, posto que permitem destacar esse tecido cicatricial específico dos demais tecidos dérmicos e analisar seu padrão morfológico com relativa segurança (FONSECA, 2003; RIBEIRO *et al.*, 2004)

A busca de meios que promovam melhoria à dinâmica do processo cicatricial há muito vem sendo discutida (PUGLIESE *et al.*, 2003, RIBEIRO *et al.*, 2004), especialmente fazendo uso de produtos naturais (MARTINS *et al.*, 2006, SEMENOPFF SEGUNDO *et al.*, 2007).

Nesta perspectiva, membranas biocompatíveis têm sido amplamente empregadas na área de saúde com intuito de estimular a cicatrização de feridas dérmicas e mucosas. As membranas podem ser absorvíveis ou não, e fatores como sua constituição, morfologia, textura da superfície, tamanho das porosidades e duração da integridade funcional podem influenciar no êxito da sua utilização no processo cicatricial. Assim, devido a sua biocompatibilidade e franca interação com a matriz extracelular, as membranas contendo colágeno têm sido bastante utilizadas na reparação de traumas mucocutâneos químicos e mecânicos (YAMATOGLI *et al.*, 2005). Além disso, a própolis, um produto natural resinoso produzido por abelhas, também tem sido bastante implicada em fenômenos de cicatrização (GRÉGIO *et al.*, 2005). No entanto, pouco se sabe acerca do papel da variedade vermelha da própolis no processo de reparo cicatricial.

A análise das secções histológicas coradas em HE levou a identificação do colágeno sob a forma de fibras e fibrilas eosinofílicas que se mostravam escassos no grupo controle sacrificado ao sétimo dia, particularmente na superfície dos espécimes. Este último achado parece ter íntima relação com a persistência da infiltração polimorfonuclear (neutrófila), já que estes leucócitos característicos da fase aguda da reação inflamatória, são responsáveis pela liberação em massa de constituintes lisossomais que, além de promover lise tissular, impedem a instalação da fase

fibroproliferativa do reparo (DIELGEMANN, EVANS, 2004). Na profundidade, contudo, onde se inicia a reação de granulação, justifica-se a observação de escassas fibrilas eosinofílicas consistentes com colágeno. Em ambos os grupos experimentais, porém, as fibras colágenas eram mais facilmente detectadas em HE, e pareciam mais aparentes no grupo tratado com membrana colágena contendo própolis vermelha.

Dentre os subtipos de colágeno fibrilar que compõem a derme destacam-se o tipo I e III. O colágeno de tipo III forma fibras delgadas constituída de fibrilas delicadas, frouxamente dispostas mostrando uma fraca birrefringência de coloração esverdeada e amarelo-esverdeadas quando analisado pela Picrossírius-polarização, O colágeno tipo I, por sua vez, forma fibras de espessura variável, dispostas paralela ou entrelaçadamente, com birrefringência amarelo-alaranjada e avermelhada (DANTAS FILHO *et al.*, 2007). No tecido dérmico normal, o colágeno Tipo I é mais abundante em planos profundos (derme reticular) e o colágeno Tipo III está presente nas camadas mais superficiais (JUNQUEIRA *et al.*, 1983). Embora este padrão de diferenciação morfológica baseada na coloração exibindo pelas fibras birrefringentes sob luz polarizada seja amplamente empregado na literatura, alguns estudiosos afirmam que, sob determinadas circunstâncias, fibras imaturas de colágeno tipo I podem ter coloração esverdeada, enquanto fibras espessas de colágeno III poderiam se apresentar amareladas (RICH, WHITTAKER, 2005).

Durante a formação do processo cicatricial, após a instalação do dano tecidual, a síntese do colágeno inicia-se logo no terceiro dia e atinge seu pico máximo entre 3 e 6 semanas seguindo-se a um período de remodelação. O colágeno tipo III é inicialmente sintetizado e depositado, sendo substituído por tipo I à medida que ocorre maturação do tecido cicatricial (FLEISCHMAJER *et al.*, 1990; CARNEIRO *et al.*, 2005). Esse processo tem relevância grande para a resistência dérmica na área cicatricial, posto que o aumento na relação entre colágeno tipo I e tipo III é determinante para a força tênsil e estabilidade mecânica do tecido conjuntivo (FRIEDMAN *et al.*, 1993).

No presente estudo, as secções coradas em Picrossírius mostraram, sob luz polarizada aos 07 dias, que o grupo controle exibia predomínio de fibras delgadas de colágeno tipo III, enquanto que os demais apresentavam maior abundância de colágeno tipo I. Estes achados sugerem que ambos os tratamentos imputados (uso de membranas de colágeno contendo ou não própolis vermelha) conduz à substituição mais rápida do padrão jovem da derme papilar (rica em colágeno Tipo III) por um tecido fibroso em maturação (rico em colágeno Tipo I).

Os achados supracitados podem encontrar explicação no fato de que o uso de membranas de colágeno provavelmente levou à menor contaminação externa, uma vez que as feridas cicatrizavam por segunda intenção, e a redução na duração da fase

inflamatória aguda teria facilitado a instalação do processo de síntese de colágeno, particularmente o tipo I. A maior birrefringência em tons amarelos observada na profundidade dos espécimes do grupo controle (G1), indicando o início da deposição de colágeno tipo I em substituição ao tipo III, justamente na região onde a reação de granulação já se instalara, parece respaldar essa teoria.

Outro aspecto relevante é que o colágeno tipo III (ou reticulina) parece ter importância crucial na orientação da migração endotelial durante os estágios iniciais da reação de granulação (RAMOS, MIRANDA, 2007). Este fato parece corroborar nossos achados morfológicos, posto que, no grupo controle (G1), onde a reação de granulação ainda se encontrava em achados precoces, predominava o colágeno III. Nos demais grupos experimentais (G2 e G3), onde a reação de granulação já estava bem instalada e havia teoricamente menor necessidade de orientação da migração vaso-endotelial, esta classe de colágeno já vinha sendo substituída pelo tipo I.

Adicionalmente, o grupo experimental G3 pareceu apresentar menos espaços interfibrilares, e orientação mais regular das fibras de colágeno I, dados que vêm sugerir que a presença da própolis vermelha pode ter desempenhado algum papel no processo de síntese e deposição colagênica. Alguns estudos indicam que as propriedades pró-cicatrizantes da própolis estão relacionadas a um provável potencial antiinflamatório e anti-oxidante, e conseqüente facilitação da proliferação fibroblástica e deposição colagênica (MARQUELE *et al.*, 2005).

Ao décimo quarto dia, a diferenciação do padrão de colagenização por meio da coloração histológica de rotina (HE) era particularmente difícil entre os grupos estudados, embora mais uma vez no grupo tratado com membranas contendo própolis vermelha o colágeno tenha parecido ser mais abundante, o que ratifica a impressão obtida na avaliação dos animais mortos em sete dias de que a própolis vermelha, mesmo em baixas concentrações, parece exercer algum efeito estimulatório sobre a síntese de colágeno.

É interessante destacar que a orientação das fibras coradas pelo HE se apresentou notadamente paralela na superfície e entrelaçada na profundidade; além disso, a densidade colagênica também foi mais intensa na profundidade. Estes achados parecem apenas tentar mimetizar a arquitetura típica do tecido conjuntivo dérmico, uma vez que as fibras colágenas na derme papilar são menos densas e tendem a uma orientação paralela, o oposto ocorrendo na derme reticular (JUNQUEIRA, 1983).

A análise sob luz polarizada revelou abundância de colágeno tipo I e persistência de esparsas e delgadas fibrilas de colágeno tipo III, indicando que o processo de colagenização se encontrava em franca maturação nos três grupos

estudados. Contudo, a hipocolagenização vista na porção superior mais central da área cicatricial no grupo controle (G4) sugere que o fenômeno de deposição e remodelação das fibras colágenas maduras vem ocorrendo de maneira mais lenta nos animais não tratados com membrana. Tais achados ratificam o papel estimulatório de membranas biológicas de colágeno sobre a formação da cicatriz colagênica anteriormente defendida por outros estudiosos (YAMATOGLI *et al.*, 2005).

Em adição, ambos os grupos experimentais (G5 e G6) demonstraram a presença de quantidade importante de estruturas fibrilares com birrefringência avermelhada, que poderiam representar o início da deposição de colágeno tipo I mais maduro (JUNQUEIRA *et al.*, 1983). No entanto, estas tinham densidade e orientação diferentes entre os grupos, parecendo menos conspícuas e tendendo ao paralelismo em G5, enquanto se mostravam mais abundantes e levemente entrelaçadas em G6. O padrão de orientação e densidade fibrosa observado em G6 foi mais semelhante àquele visto em amostras de pele normal dos mesmos animais estudados, embora nestas a espessura e densidade dos feixes fibrosos fosse claramente maior.

Mais uma vez os achados morfológicos conduzem à especulação de um provável potencial biomodulatório da própolis vermelha, mesmo em baixas concentrações, sobre fibroblastos, acelerando a síntese, deposição, maturação e remodelação de colágeno. Contudo é importante ressaltar que em nenhum dos animais que compunham o grupo G6 foi evidenciada excessiva deposição colagênica, indicando que, dentro dos parâmetros propostos neste experimento, o uso de membranas contendo própolis vermelha não levou à hipercolagenização patológica características das quelóides.

A análise dos resultados obtidos no presente estudo vem sugerir que o uso de membranas biológicas de colágeno favorece a formação cicatricial mais rápida em feridas com perda de substância (cicatrização por segunda intenção). Adicionalmente, a incorporação de extrato hidroalcolólico de própolis vermelha em baixas concentrações não oferece efeitos tóxicos e parece estimular a fibroplasia cicatricial sem induzir quelóides. No entanto, estudos posteriores são necessários a fim de elucidar o mecanismo fisiopatológico responsável pela atividade biomodulatória deste produto natural sobre a fibrogênese.

Referências

BALBINO, C.A.; PEDREIRA, L.M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 41(1) : 27-51, 2005.

CARDOSO, J.C., **Modificação do colágeno pela reação de Maillard e avaliação de formulações na forma de gel desenvolvidas a partir do material modificado**. Tese de Doutorado, USP, Ribeirão Preto, Brasil, 2005.

CARNEIRO, C.G.; SENNES, L.U.; SALDIVA, P.H.N.; TSUJI, D.H.; XIMENES FILHO, J.A. Avaliação da deposição de colágeno após implante de fásia lata e de gordura na prega vocal de coelho: estudo histomorfométrico. *Rev Bras Otorrinolaringol*. 71(2) : 798-802, 2005.

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

DANTAS FILHO, A.M; AGUIAR, J.L.A.; ROCHA, L.R.M.; AZEVEDO, I.M.; RAMALHO, E.; MEDEIROS, A.C. Effects of the basic fibroblast growth factor and its anti-factor in the healing and collagen maturation of infected skin wound. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 22(1) : 64-71, 2007.

DIEGELMANN, R.F.; EVANS, C.M. Wound healing an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Frontiers in Bioscience*. v.9 : 283-89, 2004.

FLEISCHMAJER, R.; PERLISH, J.S.; BURGESSON, R.E.; SHAIKH-BAHAI, F.; TIMPL, R. Type I and type III interactions during fibrillogenesis. *Am NY Acad Sci*; 580 : 161-175, 1990.

FONSECA, V.R.C.D. **Quantificação da deposição de colágeno de submucosa de pregas vocais suínas após exeresse de fragmento de mucosa a frio e uso de Mitomicina-C tópica**. Dissertação de Mestrado, IPEM, Curitiba, PR, Brasil, 2003.

FRIEDMAN, D.W.; BOYD, C.; MACKENZIE, J.W.; NORTON, P.; OSLOM, R.M.; BEAK, S.M. Regulation of collagen in keloids and hypertrophic scars., *J Surg Res.* 134 : 1019-1025, 1993.

GHADIALLY, F.N. Extracellular matrix, *Ultrastructural Pathology of the cell and matrix*, 4 : 1307-1399, 1997.

GRÉGIO, A.M.T.; LIMA, A.A.S.; RIBAS, M.O.; BARBOSA, A.P.M.; PEREIRA, A.C.P.; KOIKE, F.; REPEKE, C.E.P. Efeito da Propolis mellifera sobre o processo de reparo de lesões ulceradas na mucosa bucal de ratos. *Estud. Biolog*, 27(58) : 43-47, 2005.

HELARY, C., OVTRACHT, L., COULOMB, B., GODEAU, G., GIRAUD-GUILLE, M.M. Dense fibrillar collagen matrices: A model to study myofibroblast behaviour during wound healing. *Biomaterials.* 27(25) : 4443-4452, 2006.

HIRSHBERG, A.; BUCHNER, A.; DAYAN, D. The central odontogenic fibroma and the hyper plastic dental follicle: study with Picrosirius red and polarization microscopy. *Journal of Oral Pathology & Medicine.* 25(3) : 125-127, 1996.

HIRSHBERG, A.; BUCHNER, A.; DAYAN, D. Collagen fibbers in the wall of odontogenic keratocysts: a study with picrosirius red and polarizing microscopy. *Journal of Oral Pathology & Medicine.* 28(9) : 410-412, 1999.

JUNQUEIRA L.C.U.; MONTES G.S.; MARTINS J.E.C.; JOAZEIRO, P.P. Dermal collagen distribution. A histochemical and ultrastructural study. *Histochemistry*, 79 : 397-403, 1983.

LINSENMEYER, T.F. In: *Hay Ed. Cell biology of extracellular matrix.* New York, Plenum. 1991.

MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, E. P.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte I. *An. Bras. Dermatol.*, 78(4) : 393-408, 2003.

MARQUELE, F.D.; DI MAMBRO, V.M.; GEORGETTI, S.R.; CASAGRANDE, R.; VALIM, Y.M.; FONSECA, M.J. Assessment of the antioxidant activities of Brazilian

extracts of propolis alone and in topical pharmaceutical formulations. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 39 : 455-462, 2005.

MARTINS, N.L.P.; MALAFAIA, O.; RIBAS-FILHO, J.M.; HEIBEL, M.; BALDEZ, R.N.; VASCONCELOS, P.R.L.; MOREIRA, H.; MAZZA, M.; NASSIF, P.A.N.; WALLBACH, Z.T. Análise comparativa da cicatrização da pele com o uso intraperitoneal de extrato aquoso de *Orbignya phalerata* (BABAÇU). Estudo controlado em ratos. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 21(3) : 66-75, 2006.

PUGLIESE, L.S.; MEDRADO, A.P.; REIS, S.R.A.; ANDRADE, Z.A. The influence of low-level laser therapy on biomodulation of collagen and elastic fibers. *Braz Oral Res*. 17(4) : 307-313, 2003.

RABAU, M.Y.; DAYAN, D. Polarization microscopy of picosirius red stained sections: a useful method for qualitative evaluation of intestinal wall collagen. *Histol. Histopathol.*, 9(3) : 525-528, 1994.

RAMOS, A.F.N.; MIRANDA, J.L. Propolis: a review of its anti-inflammatory and healing actions. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis*. 13(4) : 698, 2007.

RIBEIRO, F.A.Q.; BORGES, J.P.; ZACCBI, F.F.S.; GUARALDO, L. Clinical and histological healing of surgical wounds treated with mitomycin C. *Laryngoscope*. 114(1): 148-152, 2004.

RICH, L.; WHITTAKER, P. Collagen and picosirius red staining: a polarized light assessment of fibrillar hue and spatial distribution. *Braz. J. morphol. Sci.* 22(2) : 97-104, 2005.

SEMENOFF SEGUNDO, A.; BOSCO, A. F.; DA MAIA, D.; RIBEIRO, R.V.; DE AGUIAR, E.B.H.; ROCATTO, G.E.G.D.; CIRILO, D.M.; BUZELLE, S.L.; SEMENOFF, T.A.D.V. Influência do aloe vera e própolis na contração de feridas em dorso de ratos. *Periodontia*. 17 (01) : 05-10, 2007.

YAMATOIGI, R.S.; RAHAL, S.C.; GRANJEIRO, J.M.; TAGA, R.; CESTARI, T.M.; LIM, A.F.M. Histologia da associação de membranas biológicas de origem bovina implantadas no tecido subcutâneo de ratos. *Ciência Rural*. 35(4) : 837-842 , 2005.

CONCLUSÕES GERAIS

Com base na avaliação dos resultados obtidos com o respectivo trabalho, pôde-se concluir que:

- ✓ O uso de membranas de colágeno tipo I bovino influencia no comportamento da microvasculatura durante o processo de reparo, e reduziu a desgranulação mastocitária, sugerindo uma aceleração dos eventos que caracterizam a reação de granulação.
- ✓ A incorporação de extrato hidroalcoólico de própolis vermelha (0,1%) nas membranas de colágeno exerceu efeitos modulatórios sobre o padrão de resposta inflamatória ao induzir maior infiltração plasmocitária, sugerindo aceleração dos eventos que caracterizam a resposta imunológica, e sobre a fibroplasia, ao induzir a deposição de colágeno mais maduro e com disposição mais semelhante à pele normal.
- ✓ A associação entre membranas de colágeno tipo-I bovino e o extrato hidroalcoólico de própolis vermelha a 0,1% propiciou, de uma forma geral, melhorias importantes no processo de reparo cicatricial por segunda intenção em ratos.