

Universidade Tiradentes

Jônatas Almeida Pires

ESTUDO HISTOMORFOLÓGICO DO EFEITO DE FILMES  
BIOATIVOS DE COLÁGENO CONTENDO PRÓPOLIS  
VERMELHA SOBRE O PROCESSO DE REPARO  
CICATRICAL POR SEGUNDA INTENÇÃO EM RATOS

Aracaju  
2008

Universidade Tiradentes

Jônatas Almeida Pires

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

Monografia apresentada à  
Universidade Tiradentes como um  
dos pré-requisitos para a obtenção  
do grau de Bacharel em Odontologia.

Júnior

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque

Co-Orientadores: Prof. Dr. Francisco Prado Reis  
Prof<sup>a</sup>. Dra. Sandra Sueli Chan  
Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Amália Gonzaga Ribeiro  
Prof<sup>a</sup>. Dra. Juliana Cordeiro Cardoso

Aracaju  
2008

Jônatas Almeida Pires

ESTUDO HISTOMORFOLÓGICO DO EFEITO DE FILMES  
BIOATIVOS DE COLÁGENO CONTENDO PRÓPOLIS VERMELHA  
SOBRE O PROCESSO DE REPARO CICATRICAL POR  
SEGUNDA INTENÇÃO EM RATOS

Monografia apresentada ao  
Curso de Odontologia da  
Universidade Tiradentes –  
UNIT, como um dos pré-  
requisitos para a obtenção do  
grau de Bacharel em  
Odontologia

Aprovada em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Banca Examinadora.

---

Prof. Dr. Ricardo Luiz C. de Albuquerque Jr.  
Universidade Tiradentes

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria de Fátima Batista de Melo.  
Universidade Tiradentes

---

Prof. MSc. Raimundo Silva Rocha.  
Universidade Tiradentes

*A Deus, porque Dele, por  
Ele e para Ele são todas  
as coisas.*

# AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho só foi possível devido ao apoio de:

DEUS, que nos deu a capacidade de raciocinar e nos iluminou quando tudo parecia difícil e nos fez sorrir quando tudo estava acabado.

Meus Pais, que me deram a força necessária para trilhar os caminhos do conhecimento até aqui e que chorando e sorrindo torcem por mim.

Prof. Ricardo Albuquerque Jr., meu orientador, que apostou em mim desde meu início acadêmico, visando sempre aumentar minha bagagem de conhecimento técnico-científico.

Amigos do ITP, Vitor, Nely, André Barreto e outros, cada amigo faz diferença quando a união de todos é necessário, obrigado pela força!

ITP e UNIT, que disponibilizou a infra-estrutura e os recursos humanos necessários para a realização deste trabalho.

*"Quanto mais aumenta nosso conhecimento, mais evidente fica nossa ignorância." John F. Kennedy*

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

Jônatas Almeida Pires, André Luiz Santos Barreto, Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior, Francisco Prado Reis, Rose Nely Pereira Filho, Sandra Sueli Chan, Maria Amália Gonzaga Ribeiro, Juliana Cordeiro Cardoso.

### **RESUMO**

Biofilmes de colágeno têm sido amplamente utilizados para melhorar a cicatrização de feridas. Alguns estudos têm investigado o efeito dos produtos naturais incorporados em tais filmes. A própolis apresenta atividades antiinflamatórias, porém poucos relatos em relação à própolis vermelha brasileira. O objetivo deste estudo foi analisar o efeito dos filmes de colágeno contendo própolis vermelha sobre cicatrização dérmica. Assim, filmes de colágeno contendo extrato de própolis vermelha foram aplicados sobre feridas dérmicas em ratos. Ao fim do 7º dia, foi observada reação inflamatória aguda no G1 (grupo sem tratamento), mas infiltrado linfocítico crônico no G2 (grupo colágeno) e linfoplasmocitário no G3 (grupo colágeno-própolis). Tecido de granulação bem desenvolvido foi encontrado nos dois grupos experimentais. Colagenização menos intensa foi representado pelas fibras de colágeno tipo III. No G2 e G3, a deposição de colágeno tipo I foi mais evidente, porém os feixes estavam mais bem organizados no último. Ao fim de 14º dia, observou-se escasso infiltrado linfoplasmocitário no G4 (grupo sem tratamento) e G5 (grupo colágeno), e infiltrado plasmocitário no G6 (grupo colágeno-própolis). A colagenização foi mais intensa no G6, lembrando o aspecto normal da derme. Nossos achados sugerem que biofilme de colágeno contendo extrato de própolis vermelha foi útil para melhorar o processo de cicatrização.

Palavras chave: Cicatrização, Filmes de colágeno, Própolis Vermelha.

## ABSTRACT

Collagen films have been used to improve wound healing and some studies have investigated the effect of natural products incorporated into these films. Propolis presents anti-inflammatory activities, but only few reports have looked at the Brazilian red propolis. The aim of this study was to analyze the effect of collagen films containing red propolis on dermal wound healing. Thus, collagen films containing red propolis extract were applied on dermal wounds of rats. On the 7<sup>th</sup> day, the inflammatory reaction was acute in G1 (untreated group), but chronic lymphocytic in G2 (collagen group) and lymphoplasmacytic in G3 (propolis-collagen group). Well-developed granulation tissue was found in both experimental groups. Collagenization was less conspicuous and represented by type-III collagen fibers. In G2 and G3, type-I collagen deposition was more evident, but the bundles were more regularly arranged in the latter. On the 14<sup>th</sup> day, scarce lymphoplasmacytic infiltrate was observed in G4 (untreated group) and G5 (collagen group), and plasmacytic in G6 (propolis-collagen group). The collagenization was more intense in G6, resembling the normal dermis appearance. Our findings suggest that collagen films containing extract of Brazilian red propolis was useful to improve dermal wound healing.

Keywords: Collagen membranes, Red Propolis, Wound healing.

## INTRODUÇÃO

A cicatrização é um processo orgânico de restauração da lesão induzida por agressão local. 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. (ARAÚJO *et al*, 1998, BRASILEIRO FILHO, 2000). Todo o processo pode ser



dividido em fases distintas, caracterizadas pela população celular predominante e segue uma seqüência conservada de eventos que se sobrepõem no tempo e incluem inflamação, proliferação e remodelação tecidual. (SINGER; CLARK, 1999).

Inicialmente, após a lesão tecidual, são liberados mediadores celulares que estimulam a vasodilatação e extravasamento de plasma, eritrócitos e leucócitos para este local que se traduz clinicamente por calor, rubor e tumor e dor. (histamina, serotonina, bradicinina, entre outros) (MANDELAUBAN et al, 2003). Neste contexto, os mastócitos, células do tecido conectivo, são responsáveis pelo desencadeamento de dos fenômenos fisiopatológicos exsudativos envolvidos na iniciação, manutenção e amplificação da resposta inflamatória, por ser fonte importante de mediadores vasoativos e quimiotáticos (YONG, 1997; METCALFE, 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).

Nas etapas posteriores o reparo do tecido conjuntivo prossegue com a formação de tecido de granulação, formado por fibras colágenas, fibroblastos e vasos sanguíneos, essencial para propiciar a futura colagenização. A produção subsequente de colágeno representa um dos fatores mais significativos para a recuperação dérmica após uma agressão (DIELGEMAN, EVANS, 2004). As fibrilas colagenosas da derme representam híbridos de subclasses bioquímicas distintas de colágenos denominados tipo I e III. O colágeno I é o mais abundante, fornecendo alta resistência à tensão da pele, tendões e ligamentos; o colágeno tipo III parece estar relacionado a fenômenos de orientação de migração celular. Durante a dinâmica cicatricial, 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). A deposição de colágeno é, portanto, um importante indicador da evolução do processo cicatricial (Diegelman, Evans, 2004).

As membranas de colágeno têm sido um dos materiais mais utilizados como adjuvante no reparo de danos químicos e mecânicos devido a sua biocompatibilidade e sua atividade pró-cicatrizante (YAMATOJI *et al.*, 2005), além de capacidade de estimular a proliferação de fibroblastos/miofibroblastos (HELARY *et al.* 2006). Em adição, alguns estudos têm se concentrado em promover a incorporação de compostos bioativos (fármacos sintéticos ou produtos naturais) em biomateriais implantáveis, a exemplo de membranas de colágeno, especialmente em virtude das vantagens relacionadas à liberação controlada do produto diretamente no tecido danificado (LEE *et al.*, 2001).

Produtos naturais fitoterápicos têm sido empregados como elementos adjuvantes na cicatrização de feridas (SEMENOFF SEGUNDO, 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. Assim, 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

## **METODOLOGIA**

### **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 rotaveaporado. 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 os procedimentos cirúrgicos 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 1cm<sup>2</sup>. 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), azul de toluidina a 0,2%, de acordo com a fórmula citada por Cavalcanti (1989) e Picrosirius Red para estudo da deposição colagênica esta coloração foi analisada sob luz polarizada.

## **ANÁLISE HISTOMORFOLÓGICA DA REAÇÃO INFLAMATÓRIA**

Para avaliação das características histomorfológicas associadas ao processo inflamatório/reativo, 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<sup>®</sup>, 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 5 $\mu$ m de espessura, separadas entre si por uma distância de 10 $\mu$ m; 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<sup>®</sup>. Após digitalização, as imagens referentes a cada campo histológico foram projetadas em monitor Samsung<sup>®</sup> 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*<sup>®</sup>. 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 DA DEPOSIÇÃO COLAGÊNICA**

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.

## **ANÁLISE DA QUANTIDADE DE MASTÓCITOS**

Os cortes corados com azul de toluidina a 0,2% 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 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.

Os dados obtidos a partir da contagem de mastócitos 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

### ANÁLISE HISTOMORFOLÓGICA DA REAÇÃO INFLAMATÓRIA

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 à 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).

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 plasmócitos (ou linfócito) 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.

## **DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE PERCENTUAL DE EPITELIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE DA FERIDA**

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.

Ao décimo quarto dia, apenas dois animais do grupo controle (G4) não demonstraram reepitelização completa da superfície da ferida (média de

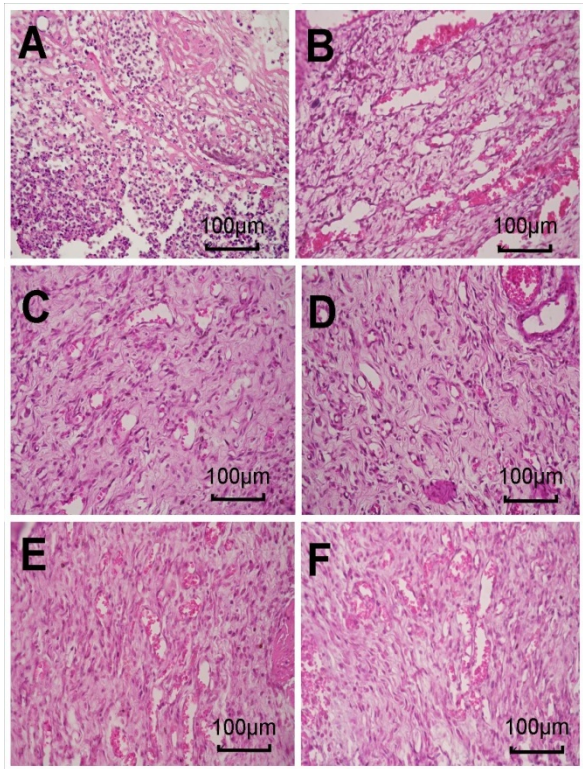
89,82±14,85%). Os demais grupos exibiram reepitelização total da ferida (figuras 4 e 5). Contudo, essa diferença não foi significativa (p=0,19).

**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.

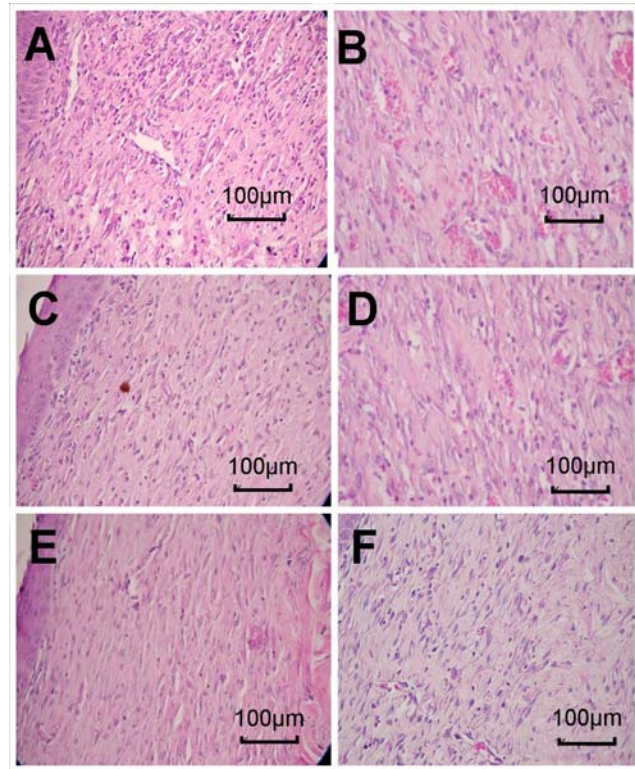
INFLAMAÇÃO		ANIMAIS				
		(R1)	(R2)	(R3)	(R4)	(R5)
G1	<b>Intensidade da inflamação</b>					
	Neutrófilos	+3	+3	+3	+3	+3
	Linfócitos	+2	+2	+2	+2	+2
	Plasmócitos	+2	+1	+1	+2	+1
	Macrófagos	+1	+1	+1	+1	+1
G2	<b>Intensidade da inflamação</b>					
	Neutrófilos	+2	+2	+2	+2	+2
	Linfócitos	+2	+3	+1	+2	+3
	Plasmócitos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

**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.

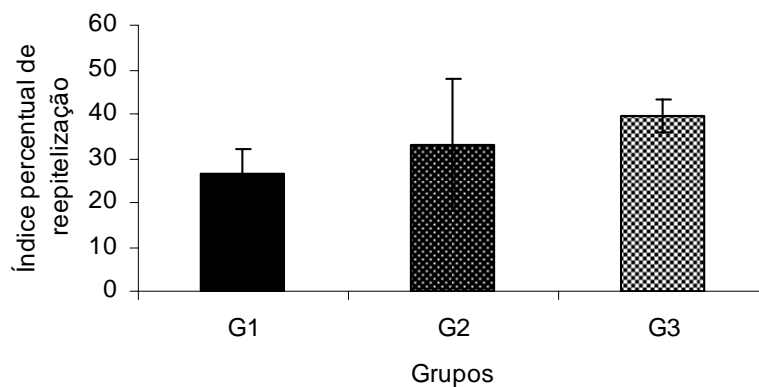
<b>INFLAMAÇÃO</b>		<b>(R1)</b>	<b>(R2)</b>	<b>(R3)</b>	<b>(R4)</b>	<b>(R5)</b>
G4	<b>Intensidade da inflamação</b>	+2	+1	+2	+2	+2
	Neutrófilos	+1	+1	+1	+1	+1
	Eosinófilos	+1	+1	+1	+1	+1
	Linfócitos	+3	+3	+3	+3	+3
	Plasmócitos	+2	+1	+2	+1	+2
	Macrófagos	+1	+1	+1	+1	+1
	Gigantócitos	+1	+1	+1	+1	+1
G5	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



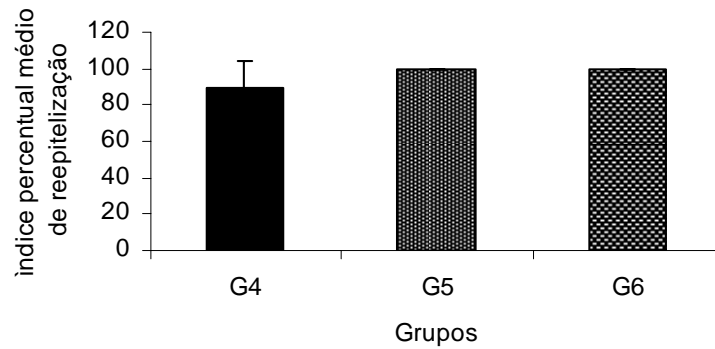
**Figura 1.** (A) Intensa infiltração neutrofílica superficial e linfocítica na profundidade, com proeminente edema intersticial (B) em G1; redução do edema e infiltração linfocítica em G2 (C e D); reação de granulação exuberante e proliferação fibroblástica evidente em G3 (E e F) (HE, 100x).



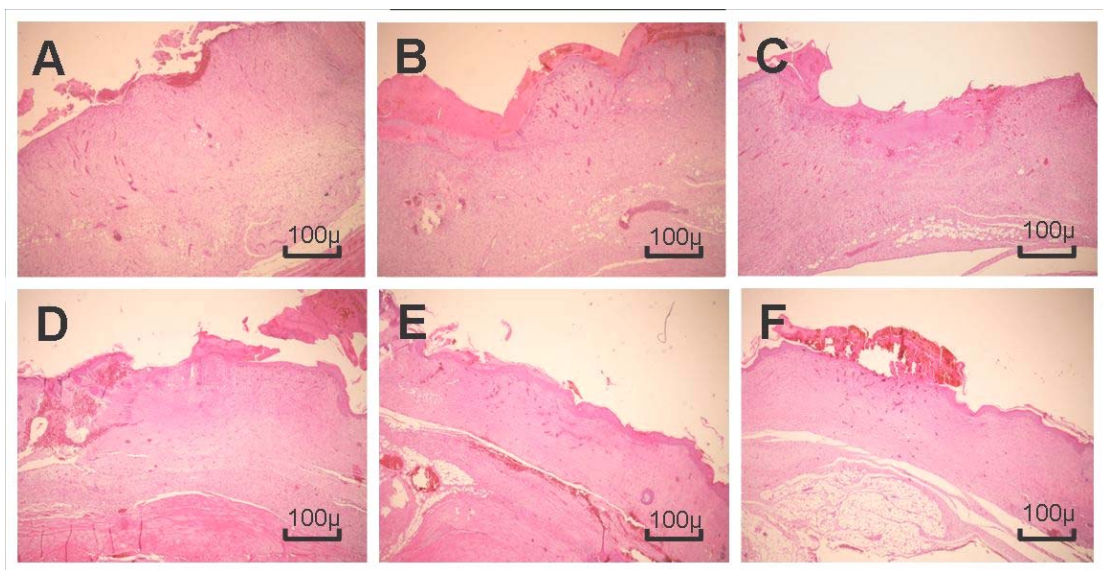
**Figura 2.** Reação inflamatória linfoplasmocitária residual em G1 (A), acompanhada de rico leito vascular (B); Os grupos G2 (C e D) e G3 (E e F) mostram ambos escassa infiltração leucocitária residual e tecido cicatricial fibroso bem formado (HE, 100x).



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



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

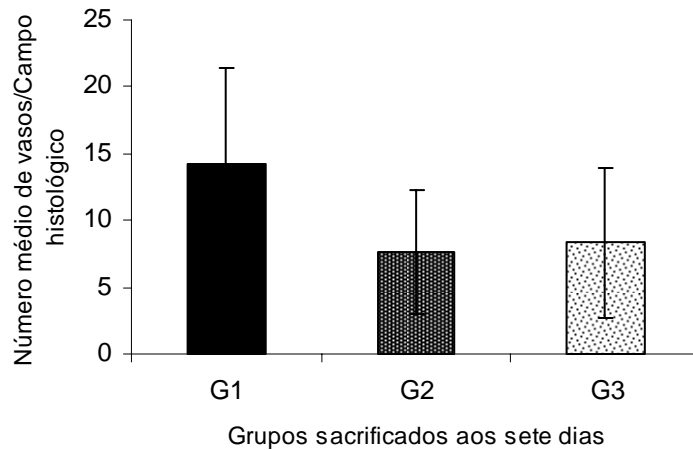


**Figura 5.** Fotomicrografias das feridas cirúrgicas exibindo reepitelização ainda incompleta em G1 (A), G2 (B) e G3 (C) em sete dias. Ao décimo quarto dia, apenas G4 (D) houve espécimes com reepitelização incompleta, enquanto que G5 (E) e G6 (F) demonstraram total reepitelização da superfície da ferida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

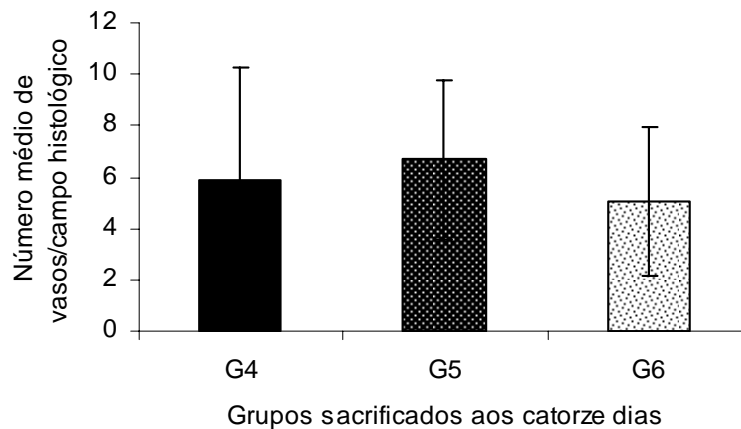
## ANÁLISE DO COMPORTAMENTO DA MICROVASCULATURA

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 ( $p=0,108$ ).



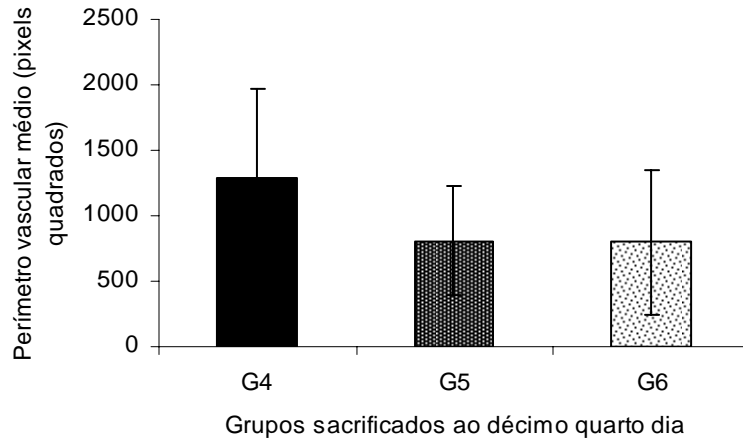
**Figura 6.** Análise quantitativa do número médio de vasos sanguíneos por campo histológico nos grupos sacrificados sete dias após os procedimentos cirúrgicos.



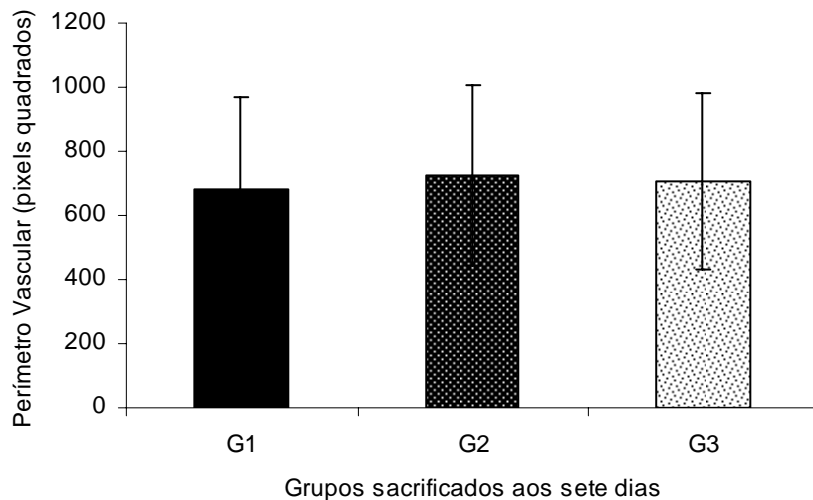
**Figura 7.** Análise quantitativa do número médio de vasos sanguíneos por campo histológico nos grupos sacrificados catorze dias após os procedimentos cirúrgicos.

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

## ANÁLISE DA DEPOSIÇÃO COLAGÊNICA

As secções coradas em Picrossírius Red examinadas sob luz polarizada revelaram, em G1, a presença de feixes fibrosos predominantemente curtos, delgados e delicados, e de aparência discretamente ondulada, com disposição

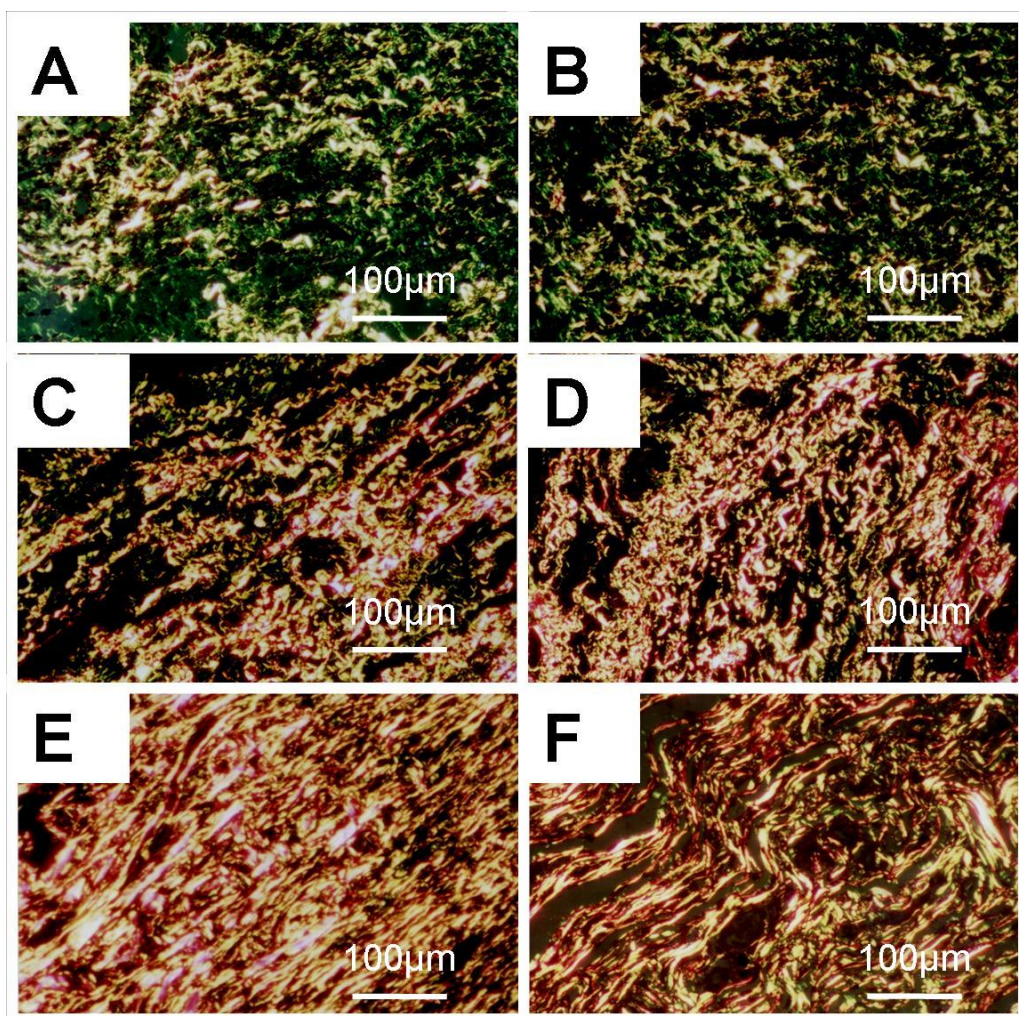
irregular e birrefringência esverdeada e amarelo-esverdeado, amplamente consistente com deposição de colágeno imaturo (tipo III). Evidenciou-se, ainda, grande quantidade de espaços interfibrilares. De especial interesse foi à observação de que os feixes mais esverdeados predominavam na superfície do 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 10).

Ao décimo quarto dia, havia predomínio de feixes fibrosos com birrefringência amarelo-alaranjado (colágeno tipo I) nos três grupos, enquanto que as estruturas fibrilares esverdeadas ou amarelo-esverdeadas (colágeno tipo III) se mostravam escassas e, quando aparentes, delgadas e delicadas. 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 11A 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 11C), já era observada a deposição de estruturas fibrilares delgadas de coloração avermelhada, sugerindo um colágeno tipo I

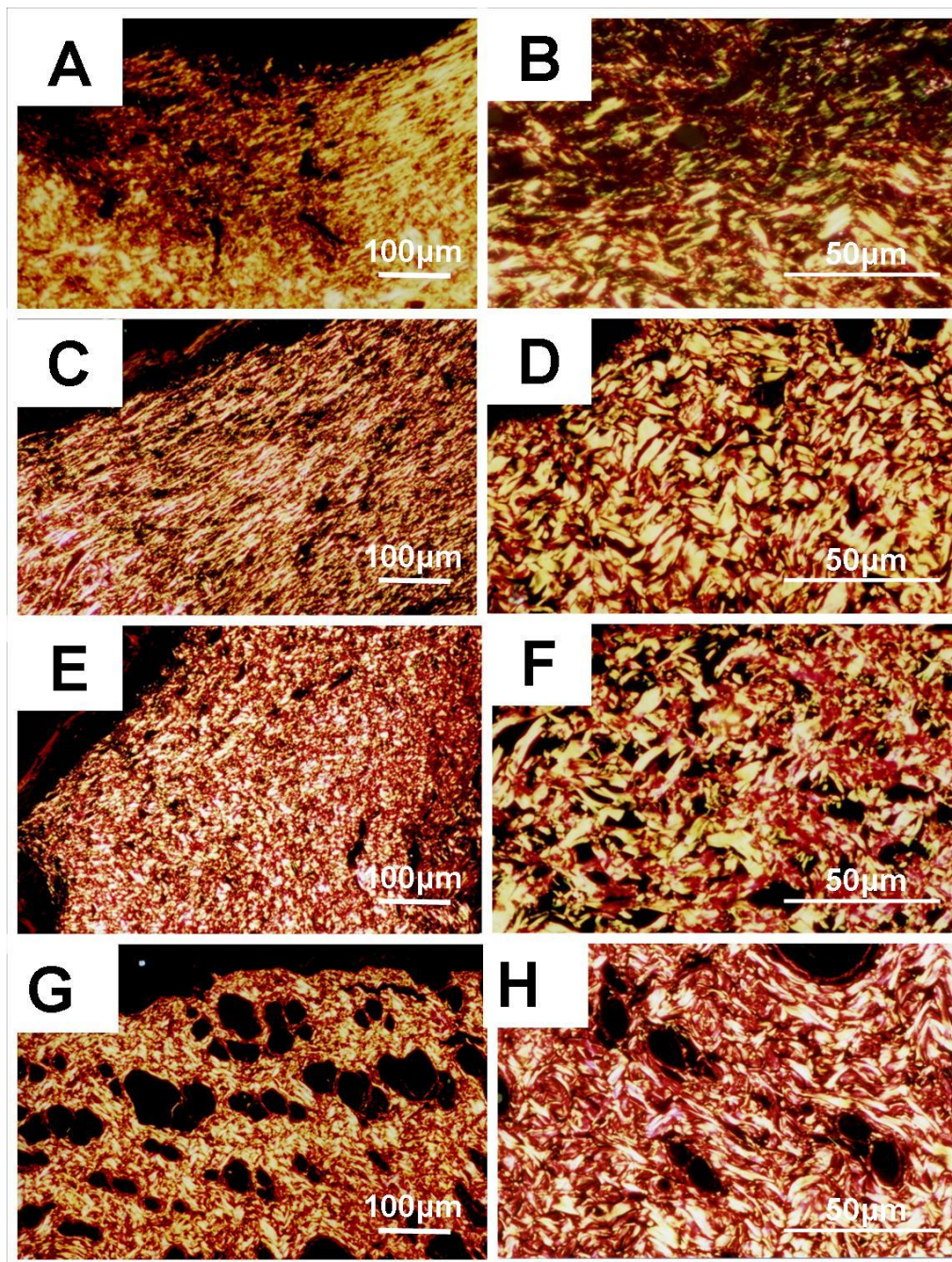


mais maduro. Destaca-se, ainda, que estas últimas fibrilas se dispunham em várias direções, mais a organização paralela à superfície era predominante (figura 11D). A disposição de fibras colágenas amarelo-alaranjadas em G6 era, de forma geral, bastante semelhante a G5, embora houvesse menor quantidade 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 10.** 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)

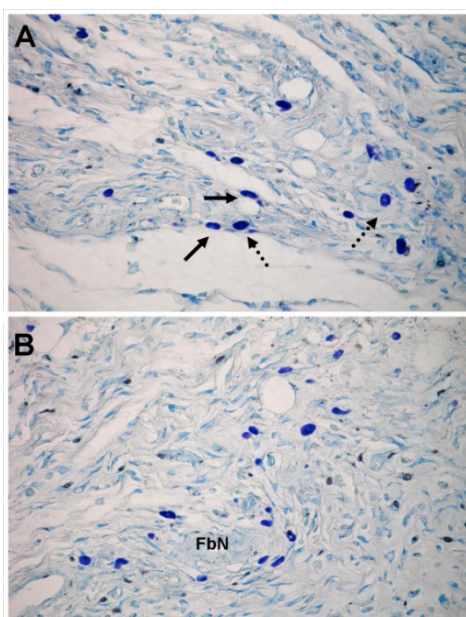


**Figura 11.** Fotomicrografias dos espécimes corados em picrossírius, observados sob luz polarizada. Grupo controle (G4) exibindo feixes colagênicos paralelos, com birrefringência amarelo-alaranjadas, que se apresentavam mais escassas na região superficial central (A) (100x). Detalhe da figura anterior 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.

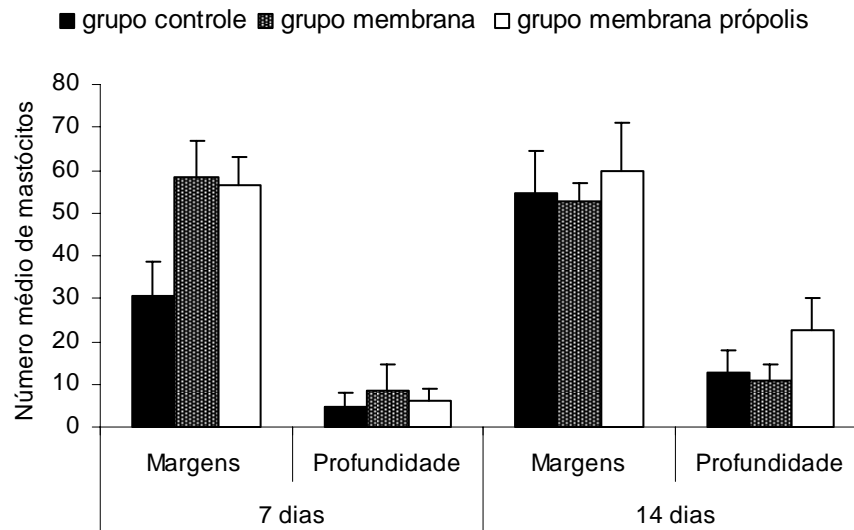
## ANÁLISE DA QUANTIDADE DE MASTÓCITOS

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 13). Em todos os casos analisados, os mastócitos mostraram-se mais numerosos nas margens da área de reparo cicatricial que na profundidade (base) (figura 14).

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 3).



**Figura 13.** 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).



**Figura 14.** 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 3.** 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 <sup>a,b,e</sup>	4,8±7,1	34,9±9,43 <sup>c,d</sup>
	G2	58,25±8,42 <sup>a</sup>	8,5±6,13	68,25±12,81 <sup>c</sup>
	G3	56,29±6,7 <sup>b</sup>	6,0±2,82	62,25±8,05 <sup>d</sup>
14 dias	G4	54,8±9,46 <sup>e</sup>	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  $p < 0,05$ ):

(<sup>a</sup>)  $p = 0,044$ ; (<sup>b</sup>)  $p = 0,049$ ; (<sup>c</sup>)  $p = 0,031$ ; (<sup>d</sup>)  $p = 0,047$ ; (<sup>e</sup>)  $p = 0,039$

## 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 conseqüência, 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 G3 ou 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 G3 ou 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 (SHRIVASTAVA *et al.*, 1990). 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 ocorrem a 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 (RIBEIRO, 2006). 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.

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 escassas 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 (neutrofílica), 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 vâsculo-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 (YAMATOIGI *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. 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 (DIELGEMAN, EVANS, 2004).



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 fimes 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 acelular 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 hidroalcolólico 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 à 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.

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.

## **CONCLUSÃO**

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.

## **SOBRE OS AUTORES**

Jônatas Almeida Pires é graduando do Curso de Odontologia da Universidade Tiradentes, Bolsista do Programa Institucional de Bolsa de Iniciação Científica do Conselho Nacional de Pesquisa (Pibic – CNPq), Estagiário do laboratório de Morfologia e Biologia estrutural do Instituto de tecnologia e Pesquisa – ITP e Monitor das disciplinas de Patologia Oral e Radiologia Oral do Curso de Odontologia da Universidade Tiradentes, Aracaju – SE.

André Luiz Santos Barreto – Especialista em Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial pelo Hospital dos Servidores do Estado/Universidade Gama Filho (RJ) e Mestre em Saúde e Ambiente pela Universidade Tiradentes, Aracaju – SE.

Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior – Doutor em Patologia Oral pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) – Pesquisador do Laboratório de Morfologia e Biologia Estrutural – Professor Titular do Programa de pós-graduação (Mestrado) em Saúde e Ambiente da Universidade Tiradentes – SE.

Francisco Prado Reis é Professor – Doutor em Ciências Biológicas pela Universidade de São Paulo - USP- Pesquisador do Laboratório de Morfologia e Biologia Estrutural – Professor Titular do Programa de pós-graduação em Saúde e Ambiente da Universidade Tiradentes, Aracaju – SE.

Rose Nely Pereira Filho – Graduando em Ciências naturais pela Universidade Tiradentes – Técnica em Laboratório (Anatomia patológica) do Laboratório de Morfologia e Biologia Estrutural – ITP – UNIT, Aracaju – SE.

Sandra Sueli Chan – Doutora em Bioquímica pela Universidade de São Paulo - USP, Professora Titular de Patologia Geral dos cursos de Odontologia e Farmácia da Universidade Tiradentes, Pesquisadora do Laboratório de Biomaterias (LBMAT), Aracaju – SE.

Maria Amália Gonzaga Ribeiro – Doutora em Laser em Odontologia pela Universidade da Bahia (UFBA) e Professora Adjunta de endodontia do Curso de Odontologia da Universidade Tiradentes, Aracaju – SE.

Juliana Cordeiro Cardoso – Doutora em Ciências Farmacêuticas pela Universidade de São Paulo (USP – Ribeirão Preto), Pesquisadora do Laboratório de Biomateriais (LMBMAT) e Professora Titular do Programa de pós-graduação em Saúde e Ambiente da Universidade Tiradentes, Aracaju – SE.

## **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), p. 232-237, 1998.

BALBINO, C.A.; PEDREIRA, L.M.; CURI, R. *Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas.* 41 (1), Jan/Mar 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* 2003;66:595-8

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

BROWN LF, et al. *Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) by epidermal keratinocytes during wound healing. J Exp Med* p.176-1375, 1992.

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, CG, SENNES, LU, SALDIVA, PHN, TSUJI, DH, XIMENES FILHO, JA. *Avaliação da deposição de colágeno após implante de fásia lata e de gordura na prega vocal de coelho: estudo histomorfométrico. Rev Bras Otorrinolaringol.*V.71, n.6, 798-802, nov./dez. 2005

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

CAVALCANTI HG. **Interferência da cortisona sobre a população de mastócitos no processo cicatricial de ratos albinus submetidos à privação crônica de alimentos** [tese]. Natal (RN): Universidade Federal do Rio Grande do Norte; 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.

DANTAS FILHO, AM; AGUIAR, JLA; ROCHA, LRM; AZEVEDO, IM; RAMALHO, E; MEDEIROS, AC. *Effects of the basic fibroblast growth factor and its anti-factor in the healing and collagen maturation of infected skin wound. Acta Cirúrgica Brasileira - Vol 22 (Supplement 1), P. 64-71, 2007.*

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**, p. 146: 56, 1995.

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

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

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.** Curitiba Paraná, p. 78-80, 2003. Dissertação (mestrado) – IPEM.

FRIEDMAN, DW; BOYD, C; MACKENZIE, JW; NORTON, P; OSLON, RM; BEAK, SM. *Regulation of collagen in keloids and hypertrophic scars.* **J Surg Res**. 1993; 134: 1019-1025.

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**, 2005. 100: 276-283.

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

GRÉGIO, AMTr; LIMA, AAS; RIBAS, MO; BARBOSA, APM; PEREIRA, ACP; KOIKE, F; REPEKE, CEP. *Efeito da Propolis mellifera sobre o processo de reparo de lesões ulceradas na mucosa bucal de ratos.* **Estud. Biolog.**, v.27, n.58, jan./mar. 2005

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

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

JUNQUEIRA L.C.U., MONTES G.S.,MARTINS J.E.C., JOAZEIRO P.P.*Dermal collagen distribution. Ahistochemical and ultrastructural study.* **Histochemistry**, v. 79, pp. 397-403, 1983

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

- LEE, C.H.; SINGLA, A.; LEE, Y. *Biomedical applications of collagen*. **Int. J. Pharm.** 221, p.1-22, 2001
- LELIEVRE, E. ; BONVALET, C. ; BRY, X. *Event history analysis of groups: the findings of an on-going research project*. **Popul.** v.1, p. 11-38, 1998.
- LIMA, AAS; GRÉGIO, AMT; FRANÇA, BHS; MACHADO, MAN; IGNÁCIO, AS; CENTURIÓN, MM; *População de mastócitos em ulcerações bucais de ratos tratadas com extrato etanólico de própolis*. **Rev. Bras. Patol. Oral.** v. 4, n.3, p. 2-9, 2005.
- LOGAN MR, ODEMUYIWA SO, MOQBEL R.. *Understanding exocytosis in immune and inflammatory cells: the molecular basis of mediator secretion*. **J Allergy Clin Immunol** 2003;111(5):923-32.
- MANARA, L.R.B.; GROMATZKY,A.; CONDE, M.C.; BRETZ, W.A. *Utilização da própolis em Odontologia*, **F.B.O.**, 7(3/4), p. 15-20, 1999.
- MANDELBAUM, S.H., DI SANTIS, É.P., MANDELBAUM, M.H.S. *Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte I*. **An. Bras. Dermatol.** July/Aug. 2003, vol.78, no.4, p.393-408.
- MARQUELE FD., DI MAMBRO VM., GEORGETTI SR., CASAGRANDE R., VALIM YM., FONSECA MJ. *Assessment of the antioxidant activities of Brazilian extracts of propolis alone and in topical pharmaceutical formulations*. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, 2005, 39, 455-62.
- MARTINS, NLP, MALAFAIA, O, RIBAS-FILHO, JM, , HEIBEL, M, , BALDEZ, RN, VASCONCELOS, PRL, MOREIRA, H, MAZZA, M, NASSIF, PAN, WALLBACH5, ZT. *Análise comparativa da cicatrização da pele com o uso intraperitoneal de extrato aquoso de *Orbignya phalerata* (BABAÇU)*. **Estudo controlado em ratos 1**. **Acta Cirúrgica Brasileira V. 21 (Suplemento 3) 2006**
- MCDUGALL 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 Sei** 2006; 364(1843): 1385-405.
- MENEZES, H. *Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas*. **Arq. Inst. Biol.**, 72(3), p. 405-411, 2005.
- METCALFE, DD; BARAM, D; MEKORI, YA. *Mast Cells*. **Physiol Rev** 1997;77(4):1033-79.
- MORIMOTO N, SASO Y, TOMIHATA K, TAIRA T, TAKAHASHI Y, OHTA M, et al. *Viability and function of autologous and allogeneic fibroblasts seeded in dermal substitutes after implantation*. **J. Surg Res.** 2005; 125(1): 56-67.



- 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, BDM; SCHWEGLER, AC; LIMA, AAS; SCUR, EM. *Avaliação de mastócitos da mucosa intestinal inflamada de ratos submetidos à ingestão de ácidos graxos insaturados.* **Rev Bras Nutr Clin.** 22(3):230-6;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**, 2005, vol.11, n. 1, ISSN 1678-9199.
- ORSOLIC N, BASIC I. *Immunomodulation by water-soluble derivative of propolis: a factor of antitumor reactivity.* **J. Ethnopharmacol** 2003; 84: 265-73.
- 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. et al. **Patologia Básica – Sinopse.** 1a ed. Editora da UFRN, Natal, 1997.
- PUGLIESE, LS, MEDRADO, AP, REIS, SRA, ANDRADE, ZA. *The influence of low-level laser therapy on biomodulation of collagen and elastic fibers.* **Braz Oral res.** 2003; 17(4): 307-313.
- RAMOS, AFN, MIRANDA, JL. *Propolis: a review of its anti-inflammatory and healing actions.* **J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.**, 2007, 13, 4, p. 698
- 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**, v. 114, p. 148-152, Jan. 2004.
- 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.
- RICH, L; WHITAKER, P. *Collagen and picrosirius red staining: a polarized light assessment of fibrillar hue and spatial distribution.* **Braz. J. morphol. Sci.** (2005) 22(2), 97-104.
- RUSSO A, LONGO R, VANELLA A. *Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl Ester and galangin.* **Fitoterapia** 2002; 73: S21-S29.
- SEMENOFF SEGUNDO, A, et al. *influência do aloe vera e própolis na contração de feridas em dorso de ratos.* **Periodontia.** vol. 17 - nº 01 – março, 2007. P. 5-10.

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

SRIVASTAVA S, GORHAM SD, FRENCH DA, SHIVAS AA, COURTNEY JM. *In vivo evaluation and comparison of collagen, acetylated collagen and collagen/glycosaminoglycan composite films and sponges as candidate biomaterials*. **Biomaterials** 1990; 11: 155-61.

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

TRUSHEVA B, POPOVA M, BANKOVA V, SIMOVA S, MARCUCCI MC, MIORIN PL, PASIN FR, TSVETKOVA I 2006. *Bioactive constituents of brazilian red propolis*. **Evid Based Complement Alternat Med** 3: 249-254.

YAMATOIGI, RS, RAHAL, SC, GRANJEIRO, JM, TAGA, R, CESTARI, TM, LIM, AFM. *Histologia da associação de membranas biológicas de origem bovina implantadas no tecido subcutâneo de ratos*. **Ciência Rural**, v.35, n.4, jul-ago, 2005.

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