

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

SILAS SANTANA NOGUEIRA

**ANÁLISE DO EFEITO DO PRÓPOLIS NO REPARO DE FERIDAS
CUTÂNEAS EM RATOS DIABÉTICOS**

**ALFENAS/MG
2013**

SILAS SANTANA NOGUEIRA

**ANÁLISE DO EFEITO DO PRÓPOLIS NO REPARO DE FERIDAS
CUTÂNEAS EM RATOS DIABÉTICOS**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Fisiopatologia. Orientador: Dr. Alessandro Antonio Costa Pereira.

**ALFENAS/MG
2013**

Nogueira, Silas Santana.

Análise do efeito do própolis no reparo de feridas cutâneas em ratos diabéticos / Silas Santana Nogueira. - 2013.

55 f. -

Orientador: Alessandro Antonio Costa Pereira.

Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Saúde) -
Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2013.

Bibliografia.

1. Diabetes Mellitus Experimental. 3. Complicações do Diabetes.
4. Própolis . 5. Cicatrizes. I. Pereira, Alessandro Antonio Costa. II.
Título.

CDD: 616.462

SILAS SANTANA NOGUEIRA

**ANÁLISE DO EFEITO DO PRÓPOLIS NO REPARO DE FERIDAS
CUTÂNEAS EM RATOS DIABÉTICOS**

A Banca examinadora abaixo-assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção de título de Mestre em Ciências pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Fisiopatologia.

Aprovada em:

Prof. *ALEXSANDRO ANTONIO COSTA PEREIRA*
Instituição: *UNIFAL*

Assinatura: 

Prof. *JOÃO ADOLFO COSTA HANEMANN*
Instituição: *UNIFAL-MG*

Assinatura: 

Prof. *Alexandre Teixeira Mendes*
Instituição: *UNIMCOR*

Assinatura: 

RESUMO

Pé diabético é uma infecção, ulceração e ou destruição do tecido devido neuropatia e doença vascular; e precedem 84% de todas as amputações dos membros inferiores relacionadas ao diabetes. A cicatrização prejudicada de feridas cutâneas em pessoas com diabetes envolve, principalmente, hipóxia, disfunção dos fibroblastos e células epiteliais, diminuição da angiogênese e neovascularização, altos níveis de metaloproteases, danos causados por espécies reativas de oxigênio (ROS), produtos finais da glicação avançada (AGEs), diminuição da resistência imunológica do hospedeiro e neuropatia. Desta forma o objetivo deste trabalho foi propor a análise do efeito da pomada de própolis a 10%, no reparo tecidual de feridas cutâneas de ratos diabéticos. Foram utilizados 32 animais, que foram divididos em GRUPO 1 (24 animais) e GRUPO 2 (8 animais), todos os animais foram submetidos ao protocolo de indução do diabetes, porém, o GRUPO 1 recebeu solução aquosa de aloxana via intraperitoneal, enquanto que, o GRUPO 2 recebeu solução salina a 0,9% na mesma via. Após a constatação do diabetes ao décimo dia após a indução do diabetes experimental, cada animal foi anestesiado e submetido a realização de 3 lesões com Punch de 5mm na linha média no dorso do animal. A primeira lesão recebeu tratamento tópico com pomada de própolis comercial a 10%; a segunda lesão recebeu tratamento tópico com dexametasona a 0,1%, e a terceira lesão recebeu tratamento tópico com solução salina a 0,9%, todos cobrindo a totalidade da ferida. As lesões foram mensuradas e o valor do diâmetro utilizado para o cálculo da contração de lesão. Os animais foram eutanasiados e os espécimes das lesões foram fixados em paraformaldeído tamponado com pH 7,4 por 48 horas. Os espécimes foram processados, montados em blocos de parafina, cortados em micrótomo a 4 μ m e corados com técnica de coloração por Hematoxilina e Eosina. Foram analisados: infiltrado de neutrófilos, infiltrado de macrófagos, tecido de granulação e reepitelização. A análise microscópica desses fenômenos foi qualitativa, global e subjetiva e considerou a presença e a intensidade desses fenômenos, comparativamente entre os grupos experimentais. Os resultados encontrados demonstram que: A contração das lesões cutâneas dos grupos foi sempre maior nos animais tratados com própolis, seguido pelos tratados com dexametasona e solução salina ($p=0,03$). A média do infiltrado de macrófagos dos animais no grupo 2, foi: 1,72 ($p=0,02$) para os tratados com própolis, de 1,47 para os tratados com dexametasona e de 1,40 para os tratados com solução salina. A média do infiltrado de neutrófilos dos animais no grupo 1, foi: 1,22 ($p=0,0036$) para os tratados com própolis, de 1,31 para os tratados com dexametasona e de 1,49 para os tratados com salina. A média de formação do tecido de granulação no grupo 1, foi: 1,87 ($p=0,01$) para os tratados com própolis, de 1,58 para os tratados com dexametasona e de 1,58 para os tratados com salina. E a média de reepitelização dos animais tratados no grupo 1, foi: 1,72 ($p=0,03$) para os tratados com própolis, de 1,58 para os tratados com dexametasona e de 1,65 para os tratados com salina.

Palavras Chaves: Úlceras do pé diabético. Própolis. Cicatrização.

ABSTRACT

Diabetic foot is an infection, and ulceration or tissue destruction due to neuropathy and vascular disease, and above 84 % of all lower limb amputations related to diabetes. The impaired healing of skin wounds in people with diabetes mainly involves hypoxia, dysfunction of fibroblasts and epithelial cells, decreased angiogenesis and neovascularization, high levels of metalloproteinases, damage caused by reactive oxygen species (ROS), advanced glycation end products (AGEs), decreased resistance of the host immune and neuropathy. Thus the aim of this work was to propose an analysis of the effect of propolis cream 10% in tissue repair of skin wounds in diabetic rats. 32 animals were used, which were divided into group 1 (24 animals) and group 2 (8 animals), all animals were subjected to the protocol of induction of diabetes, however, the first group received aqueous alloxan intraperitoneally, while the second group received saline 0.9 % in the same pathway. After the introduction of the tenth day after diabetes induction of experimental diabetes, each animal was anesthetized and subjected to three conducting lesions with a 5mm punch in the dorsal midline of the animal. The first lesion was treated with topical ointment commercial 10% propolis, the second lesion received topical treatment with 0.1% dexamethasone, and the third lesion received topical treatment with 0.9% saline solution, each covering the entire wound. The lesions were measured diameter value and used to calculate the contraction of injury. The animals were euthanized and specimens of lesions were fixed in paraformaldehyde buffered at pH 7.4 for 48 hours. The specimens were processed, mounted in paraffin, cut in the microtome at 4 μ m and stained with staining technique by hematoxylin and eosin. Were analyzed neutrophil infiltration, macrophage infiltration, granulation tissue and epithelialization. Microscopic analysis of these phenomena is qualitative and subjective global and considered the presence and intensity of these phenomena compared between the experimental groups. The results show that: The contraction of the cutaneous lesions of both groups was always greater in animals treated with propolis, followed by dexamethasone treated and saline ($p = 0.03$). Mean macrophage infiltration of animals in group 2, was: 1.72 ($p = 0.02$) for those treated with propolis, 1.47 for those treated with dexamethasone and 1.40 for saline-treated. The mean neutrophil infiltration of the animals in group 1 were: 1.22 ($p = 0.0036$) for those treated with propolis, 1.31 for those treated with dexamethasone and 1.49 for those treated with saline. The average formation of granulation tissue in group 1 were: 1.87 ($p = 0.01$) for those treated with propolis, 1.58 for those treated with dexamethasone and 1.58 for those treated with saline. And the average epithelialization of the treated animals in group 1 were: 1.72 ($p = 0.03$) for those treated with propolis, 1.58 for those treated with dexamethasone and 1.65 for those treated with saline.

Key words: Diabetic foot ulcers. Propolis. Healing.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Mensuração da área do dorso do animal após a tricotomia.....	25
Figura 2 -	Representação das lesões no dorso dos animais.....	26
Figura 3 -	Realização das lesões cutâneas com Punch de 5mm.....	26
Figura 4 -	Representação das feridas e do tipo de tratamento.....	27
Figura 5 -	Mensuração do diâmetro das lesões cutâneas.....	30
Figura 6 -	Modelo de tabela para preenchimento dos dados obtidos na análise microscópica.....	31
Figura 7 -	Fotomicrografias representativas dos cortes histológicos das lesões cutâneas dos ratos dos Grupos 1 e 2 no período de 4 dias. (A, C, E) Cortes histológicos animais do Grupo 1, sendo (A) Tratados com solução salina, (C) tratados com dexametasona e (E) tratados com Própolis. (B, D, F) Cortes histológicos dos animais do Grupo 2, sendo (B) dos animais tratados solução salina, (D) tratados com dexametasona e (F) tratados com Própolis. (HE-10X).....	37
Figura 8 -	Fotomicrografias representativas dos cortes histológicos das lesões cutâneas dos ratos dos Grupos 1 e 2 no período de 10 dias. (A, C, E) Cortes histológicos animais do Grupo 1, sendo (A) tratados com solução salina, (C) tratados com dexametasona e (E) tratados com Própolis. (B, D, F) Cortes histológicos dos animais do Grupo 2, sendo (B) dos animais tratados solução salina, (D) tratados com dexametasona e (F) tratados com Própolis.....	38
Figura 9 -	Fotomicrografias representativas dos cortes histológicos das lesões cutâneas dos ratos dos Grupos 1 e 2 no período de 4 dias. (A, C, E) Cortes histológicos animais do Grupo 1, sendo (A) tratados com solução salina, (C) tratados com dexametasona e (E) tratados com Própolis. (B, D, F) Cortes histológicos dos animais do Grupo 2, sendo (B) dos animais tratados solução salina, (D) tratados com dexametasona e (F) tratados com Própolis. (HE-40X).....	39

Figura 10 - Fotomicrografias representativas dos cortes histológicos das lesões cutâneas dos ratos dos Grupos 1 e 2 no período de 10 dias. (A, C, E) Cortes histológicos animais do Grupo 1, sendo (A) tratados com solução salina, (C) tratados com dexametasona e (E) tratados com Própolis. (B, D, F) Cortes histológicos dos animais do Grupo 2, sendo (B) dos animais tratados solução salina, (D) tratados com dexametasona e (F) tratados com Própolis.(HE-40X).....

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Taxa de variação de glicemia dos grupos 1 e 2 na pré-indução e pós-indução do diabetes.....	32
Tabela 2 -	Taxa de variação de peso dos grupos 1 e 2 na pré-indução e pós-indução do diabetes.....	33
Tabela 3 -	Média de contração das lesões cutâneas dos grupos 1 e 2, conforme os tratamentos, grupos e períodos.....	33
Tabela 4 -	Média do infiltrado de mononuclear (M ϕ) de lesões cutâneas, conforme os grupos e períodos.....	34
Tabela 5 -	Média de infiltrado de polimorfonuclear (PMN) de lesões cutâneas, conforme os tratamentos, grupos e períodos.....	34
Tabela 6 -	Média de formação do tecido de Granulação dos animais, conforme os tratamentos, grupos e períodos.....	35
Tabela 7 -	Média de formação de reepitelização dos animais, conforme os tratamentos, grupos e períodos.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DM - Diabetes mellitus

ADP - Difosfato de adenosina

TxA2 - Tromboxano

PAF - Fator de ativação de plaquetas

TGF β - Fator crescimento transformador beta

C5a - Anafilatoxina produzida pela clivagem da proteína C5 do sistema complemento

IL 1b - Interleucina 1b

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral alfa

IL 6 - Interleucina 6

EFG - Fator de crescimento epidérmico

ROS - Espécies reativas de oxigênio

AGEs - Produtos finais de glicação avançada

RAGE - Receptores dos produtos finais de glicação avançada

MMPs - Metaloproteases

ECPs - Células precursoras endoteliais

VEGF - Fator de crescimento endotelial vascular

HE - Hematoxilina-eosina

SUMARIO

1 -	INTRODUÇÃO.....	10
2 -	PROPOSIÇÃO.....	11
3 -	REVISÃO DE LITERATURA.....	12
3.1 -	CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS.....	12
3.1.1 -	Fase de hemostasia.....	12
3.1.3 -	Fase inflamatória.....	13
3.1.3 -	Fase Proliferativa.....	15
3.1.4 -	Fase de remodelamento.....	16
3.2 -	DIABETES.....	17
3.3 -	CICATRIZAÇÃO E DIABETES.....	18
3.4 -	PRÓPOLIS.....	21
4 -	MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
4.1 -	ANIMAIS.....	23
4.2 -	GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	23
4.3 -	INDUÇÃO DO DIABETES.....	24
4.4 -	PROCEDIMENTO CIRÚRGICO.....	24
4.5 -	TRATAMENTO DAS FERIDAS.....	26
4.6 -	ANÁLISE DO PRÓPOLIS.....	27
4.6.1 -	Obtenção do extrato de própolis.....	27
4.6.2 -	Teor de flavonóides totais.....	27
4.6.3 -	Teor de fenóis totais.....	28
4.7 -	PROCEDIMENTOS UTILIZADOS PARA EUTANASIA DOS ANIMAIS AVALIAÇÃODAS FERIDAS.....	28
4.8 -	MEDIÇÕES DA CONTRAÇÃO DA FERIDA.....	29
4.9 -	MICROSCOPIA.....	30
5 -	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	31
6 -	RESULTADOS.....	32
7 -	DISCUSSÃO.....	43
8 -	CONCLUSÃO.....	49
	REFERÊNCIAS.....	50

1 – INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus (DM) é um importante problema em saúde pública, sua incidência e prevalência estão aumentando, a ponto de atingir proporções epidêmicas (BONA et al, 2010).

E a maior sobrevivência de indivíduos diabéticos aumenta, portanto, as chances de desenvolvimento de complicações crônicas relacionadas ao estado hiperglicêmico. Tais complicações: macroangiopatia, retinopatia, nefropatia e neuropatias, podem ser muito debilitantes ao indivíduo e muito onerosas ao sistema de saúde. Das complicações, a doença cardiovascular é a primeira causa de morte em indivíduos com DM tipo II, a retinopatia a principal causa de cegueira adquirida, a nefropatia uma das maiores responsáveis por tratamentos de diálise e transplantes, e o pé diabético, importante causa de amputações de membros inferiores (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2011).

As úlceras do pé diabético são um problema crescente em todo o mundo, devido ao aumento da prevalência do diabetes. Pacientes com diabetes desenvolvem doença vascular e neuropatia nos membros inferiores, com formação de úlceras crônicas, que são muitas vezes iniciadas por um pequeno trauma. Úlceras do pé diabético afetam pelo menos 15% de todos os pacientes com diabetes e precedem 85% de todas as amputações de perna relacionados ao diabetes (NEIDRAUER, 2010). Elas levam à dor, ao sofrimento e à má qualidade de vida de seus portadores, sendo uma das principais causas mundiais de internações hospitalares de pessoas com diabetes (BREM, TOMIC-CANIC, 2007).

O aumento em todo o mundo na prevalência de DM reforça a procura por soluções para sua prevenção, bem como a contenção de seu desenvolvimento, e da progressão de suas complicações (BERNARDI et al., 2012).

O própolis tornou-se objeto de inúmeros estudos realizados em todo o mundo, a fim de analisar sua composição química bem como suas propriedades medicinais. Conhecido por suas propriedades biológicas e farmacológicas desde a antiguidade, tem sido amplamente empregado na medicina tradicional e complementar devido às suas atividades antibacterianas, anti-sépticas, anti-inflamatórias e anestésicas (KRÓL, 2013).

2 – PROPOSIÇÃO

Este trabalho visa analisar o efeito da pomada de própolis no reparo tecidual de feridas cutâneas de ratos diabéticos.

Detalhadamente os objetivos deste estudo são:

- Analisar a evolução da contração das feridas em animais diabéticos e não diabéticos tratados e não tratados com própolis a 10% proveniente de abelhas da espécie *Apis mellífera* adquirido em farmácia de manipulação.
- Analisar a histomorfologia das feridas em animais diabéticos e não diabéticos tratados e não tratados com própolis a 10% proveniente de abelhas da espécie *Apis mellífera* adquirido em farmácia de manipulação.

3 - REVISÃO DE LITERATURA

3.1 - CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS

A capacidade auto-regenerativa é um fenômeno universal nos organismos vivos, e nos organismos superiores a cura de tecidos ocorre de duas formas: (1) pela regeneração com a recomposição da atividade funcional do tecido ou (2) pela cicatrização com restabelecimento da homeostasia do tecido com perda da sua atividade funcional pela formação de cicatriz fibrótica (BALBINO, PEREIRA, CURI, 2005, PEREIRA, 2009, REINKE, SORG, 2012).

A cicatrização de feridas é reconhecida como fator importante na manutenção da saúde desde o início da humanidade, sendo que Hipócrates indicou a importância da drenagem do pus das feridas, e Galen descreveu os princípios da cicatrização de feridas por primeira e segunda intenção. Dessa forma, a capacidade de cicatrizar ou regenerar tecidos, proporciona ao organismo uma maneira de restabelecer funções orgânicas de forma contínua, importante a manutenção da vida (REINKE, SORG, 2012).

O processo de cicatrização de feridas é complexo e envolve uma série de sobreposição de fases, que incluem: hemostasia, inflamação, proliferação e remodelamento (SCHWACHA et al., 2010).

Estas fases da cicatrização devem ocorrer em uma sequência correta, em um momento específico, mantendo-se por um período e uma intensidade ideais. Muitos fatores podem afetar a cicatrização das feridas, interferindo nestas fases, causando uma cicatrização inadequada ou deficiente (GUO, DIPIETRO, 2010).

3.1.1 - Fase de hemostasia

É a primeira fase da cura de feridas e é voltada à hemostasia e à formação de uma matriz provisória, ocorrendo imediatamente após a agressão sendo completada após algumas horas (REIKE, SORG, 2012).

Com a ruptura de vasos sanguíneos e conseqüentemente ao extravasamento de seus constituintes iniciam-se os eventos para restabelecer a hemostasia voltados para o tamponamento dos vasos (BALBINO, PEREIRA, CURI, 2005, GURTNER, 2008, PEREIRA, 2009;

REINKE, SORG, 2012). Inicialmente ocorre uma vasoconstrição transitória, seguida da deposição de plaquetas, sua ativação e posterior recrutamento de mais plaquetas para consolidar a formação do coágulo (BALBINO, PEREIRA, CURI, 2005, KUMAR, ABBAS, FAUSTO, 2005, PEREIRA, 2009).

Para o recrutamento e a ativação das plaquetas concorrem vários mediadores químicos, tais como o difosfato de adenosina (ADP) liberado pelas hemácias, o tromboxano (TxA₂) oriundo das plaquetas e o Fator de ativação de plaquetas (PAF) oriundo de macrófagos e mastócitos. Quando ativadas, as plaquetas liberam fator de transformação de crescimento beta (TGF-β), fator de crescimento derivados de plaquetas, quimiocinas, entre outras, que orientam a migração das células envolvidas na resposta inflamatória (BALBINO, PEREIRA, CURI, 2005, KUMAR, ABBAS, FAUSTO, 2005, PEREIRA, 2009).

No final desse processo, a matriz provisória é formada, pela interação das proteínas dos grânulos plaquetários, das proteínas da matriz extracelular e dos corpos plaquetários, tornando-se consistentes à medida que ocorre a deposição de fibrina, sendo um alicerce para as células responsáveis pela cicatrização (BALBINO, PEREIRA, CURI, 2005, GURTNER, 2008, PEREIRA, 2009, REINKE, SORG, 2012).

3.1.2 - Fase inflamatória

Na fase inflamatória ocorre a liberação de fatores de crescimento, citocinas, e quimiocinas que orquestram a infiltração celular e vascular necessária para a cicatrização de tecidos (BALBINO, PEREIRA, CURI, 2005, GURTNER, 2008, PEREIRA, 2009, SCHWACHA et al., 2010, REINKE, SORG, 2012).

A ação de mediadores químicos locais durante a inflamação aguda originam os eventos macroscópicos que são: rubor (vermelhidão), tumor (inchaço), calor e dor. Embora esses sinais cardinais da inflamação sejam conhecidos há mais de 2.000 anos, os eventos celulares e moleculares que regulam a resposta inflamatória e sua resolução, apenas recentemente estão sendo compreendidos (KUMAR, ABBAS, FAUSTO, 2005, SPITE, SERHAN, 2011).

A resposta inflamatória aguda ao estresse biológico envolve uma cascata de eventos mediada por uma grande variedade de células (os mastócitos, os macrófagos, os neutrófilos, as células natural Killer, as células dendríticas e os linfócitos T e B) e moléculas (citocinas,

radicais livres e padrões moleculares associados a patógenos) que localizam patógenos invasores e/ou as células e tecidos destruídos, recrutam outras células, estimulam a síntese de moléculas, eliminam os agentes agressores e promovem a homeostasia do tecido (KUMAR, ABBAS, FAUSTO, 2005, ABBAS, 2008, VODOVOTZ et al., 2010).

Os neutrófilos são os leucócitos que primeiramente alcançam o local agredido, inicialmente sendo passivamente coletados com a função de combater qualquer micro-organismo invasor, além de sintetizarem quimiocinas responsáveis pelo recrutamento de novos neutrófilos. As células endoteliais, os pericitos e os macrófagos também produzem quimiocinas responsáveis pela atividade quimiotática e ao final de 24 horas, o neutrófilo é o tipo celular predominante na ferida (ABBAS, 2008, GURTNER, 2008, PEREIRA, 2009, REINKE, SORG, 2012).

Mediadores químicos gerados a partir de sistemas celulares ou plasmáticos (eicosanóides, C5a) também contribuem para o gradiente quimiotático, assim como, citocinas pró-inflamatórias dos grânulos dos mastócitos e produtos da fibrinólise. E à medida que neutrófilos, macrófagos e fibroblastos chegam ao local, um mecanismo de retroalimentação positiva proporciona que mais células sejam recrutadas para o infiltrado inflamatório (BALBINO, PEREIRA, CURI, 2005, KUMAR, ABBAS, FAUSTO, 2005, PEREIRA, 2009).

Os eicosanóides, as citocinas produzidas por macrófagos e mastócitos (IL 1b, TNF- α , IL6) e outros mediadores induzem a expressão de proteínas de adesão nas células endoteliais; e assim glicoproteínas e integrinas presentes nos leucócitos ligam-se a selectinas e a uma superfamília de imunoglobulinas (ICAM, VCAM e PECAM) presentes nas células endoteliais (BALBINO, PEREIRA, CURI, 2005, KUMAR, ABBAS, FAUSTO, 2005, ABBAS, 2008, PEREIRA, 2009).

Os macrófagos têm uma função fundamental no processo de cicatrização, sendo responsáveis pela produção de citocinas, fatores de crescimento, enzimas, eicosanóides, fagocitose e apresentação de antígenos aos linfócitos T auxiliares (KUMAR, ABBAS, FAUSTO, 2005, ABBAS, 2008, PEREIRA, 2009). A ativação de macrófagos ocorre tanto pela ligação de mediadores químicos aos seus receptores, quanto pela baixa tensão de oxigênio, baixo pH e produção de ácido láctico no local da ferida (BALBINO, PEREIRA, CURI, 2005, PEREIRA, 2009).

3.1.3 - Fase Proliferativa

A fase proliferativa segue e se sobrepõe à fase inflamatória e é caracterizada por proliferação e migração epitelial na ferida (reepitelização). No processo de cura da derme, fibroblastos e células endoteliais são as células mais importantes, pois participam na formação de colágeno, de tecido de granulação e da reepitelização. Os fibroblastos produzem colágeno, bem como glicosaminoglicanos e proteoglicanos, que são os principais componentes da matriz extracelular (MEC) (GUO, DIPIETRO, 2010).

Os macrófagos liberam mediadores químicos e intensificam a migração e ativação dos fibroblastos (BALBINO, PEREIRA, CURI, 2005, GURTNER, 2008, PEREIRA, 2009, REINKE, SORG, 2012).

Os fibroblastos ativados migram da periferia para o centro da ferida onde produzem colágeno, substituindo a matriz extracelular existente por tecido conjuntivo mais forte e mais elástico. Para a eficiência desse processo, é necessária a angiogênese formada devido a fatores de crescimento e baixa tensão de oxigênio, sendo que as células endoteliais atravessam a parede do vaso e migram até a região da lesão, onde sofrem diferenciação e maturação formando os novos vasos (BALBINO, PEREIRA, CURI, 2005, GURTNER, 2008, PEREIRA, 2009, REINKE, SORG, 2012).

Assim, macrófagos, fibroblastos e grande quantidade de vasos sanguíneos neoformados, suportados por uma matriz frouxa composta de fibronectina, ácido hialurônico e colágenos I e II, formam o tecido de granulação, que é edematoso e bastante hemorrágico (BALBINO, PEREIRA, CURI, 2005, GURTNER, 2008, REINKE, SORG, 2012).

Dois eventos contribuem para preenchimento do leito da ferida aberta, repondo o tecido destruído pela agressão: a própria anatomia da lesão proporcionando a migração e proliferação de células (fibroblastos e células epiteliais), e a diferenciação dos fibroblastos em miofibroblastos possibilitando o movimento das margens, uma em direção à outra (BALBINO, PEREIRA, CURI, 2005, ALBERTS, 2010).

Fibroblastos produzem fibronectina e ácido hialurônico nas primeiras fases da cicatrização, responsáveis respectivamente pela fixação das células e resistência do tecido. À medida que o processo evolui o ácido hialurônico é substituído por proteoglicanos e glicosaminoglicanos, favorecendo a mobilização das células e possibilitando a mudança fenotípica delas, principalmente a maturação de fibroblastos que passam a produzir

colágeno. E nesse período, o aumento da concentração de oxigênio devido aos vasos neoformados é de extrema importância para a hidroxilação dos resíduos de prolina e lisina na formação do colágeno (BALBINO, PEREIRA, CURI, 2005, ALBERTS, 2010).

Concomitantemente ocorre a reepitelização, sendo necessário que o tecido de granulação alcance a epiderme e sirva de alicerce às células epiteliais, e também, que seja produzido o fator de crescimento epidérmico (EGF). Dessa forma, células epiteliais provenientes da camada basal e células epiteliais adjacentes migram para o centro da lesão para a formação de um novo tecido epitelial (BALBINO, PEREIRA, CURI, 2005, GURTNER, 2008, REINKE, SORG, 2012).

Ao final dessa fase, ocorre aumento da quantidade de colágeno no tecido de granulação e tem há a formação da cicatriz (BALBINO, PEREIRA, CURI, 2005, KUMAR, ABBAS, FAUSTO, 2005, GURTNER, 2008, PEREIRA, 2009, REINKE, SORG, 2012).

3.1.4 - Fase de remodelamento

Após a síntese da matriz extracelular, o processo de cura entra na fase de remodelação, que podem durar anos. Nesta fase ocorre a regressão de muitos dos capilares recém-formados e a densidade vascular da ferida retorna ao normal. Uma característica crítica desta fase é a remodelação para uma arquitetura que se aproxima da do tecido normal. A ferida também sofre contração física ao longo de todo o processo, possivelmente mediada por miofibroblastos (GUO, DIPIETRO, 2010).

Por volta do décimo dia, a ferida está totalmente preenchida por tecido de granulação, com uma rede de capilares sanguíneos atravessando-o e, com a rede linfática em franca regeneração, devido a sua reconstrução ter se iniciado posteriormente a dos vasos sanguíneos. O tecido de granulação vai sendo organizado com mais fibras colágenas e começa a adquirir a aparência de uma massa fibrótica característica da cicatriz (BALBINO, PEREIRA, CURI, 2005, GURTNER, 2008, REINKE, SORG, 2012;).

O processo de remodelamento da cicatriz envolve etapas sucessivas de produção, digestão e orientação das fibrilas de colágeno. A deposição de colágeno é feita, a princípio, de maneira aleatória tendo como orientação a organização da fibronectina e é dependente da natureza e direção das tensões aplicadas ao tecido. Essas fibras são subsequentemente digeridas pela colagenase, sendo ressintetizadas e rearranjadas de acordo com a

organização das fibras do tecido conjuntivo adjacente e lateralmente unidas por ligações covalentes. Essas ligações são formadas entre moléculas de tropocolágeno no âmbito da fibrila e entre as próprias fibrilas. Repetições sucessivas da lise, ressíntese, redirecionamento e religação formam fibras maiores de colágeno e o aspecto da cicatriz fica mais regular. Isso aumenta a sua resistência devido à organização das fibras que acompanham as forças mecânicas a que o tecido está sujeito durante a atividade normal (GENESER, 2000, BALBINO, PEREIRA, CURI, 2005, GURTNER, 2008, REINKE, SORG, 2012).

3.2 – DIABETES

O diabetes mellitus (DM) é um grupo de doenças metabólicas em que o indivíduo mantém níveis elevados de glicose no sangue, devido à produção insuficiente de insulina ou ao não reconhecimento das células à insulina produzida pelo pâncreas. Os sintomas clássicos da doença são a poliúria (micção frequente), a polidipsia (sede aumentada) e a polifagia (aumento da fome) (KOLLURU et al., 20012).

O DM é considerado um importante problema em saúde pública, com incidência e prevalência atingindo proporções epidêmicas pelo aumento significativo nos últimos anos e estima-se que mais de 400 milhões de pessoas sofrerão de DM no ano de 2030 em todo o mundo (BONA et al., 2010, THOOPPUTRA, 2012).

O DM pode ser classificado em dois tipos principais: diabetes tipo I, em que a insulina é necessária para a sobrevivência e diabetes do tipo II, o mais comum, e relacionado com desordem na secreção de insulina ou na sensibilidade à mesma (THOOPPUTRA, 2012).

Outros tipos de DM podem ocorrer, como a induzida por defeitos genéticos na função das células β ; defeitos genéticos na ação da insulina; por doenças do pâncreas exócrino (tal como fibrose cística); por drogas químicas (tais como no tratamento de HIV /AIDS ou após transplante de órgãos) e o diabetes mellitus gestacional, diagnosticado durante a gravidez (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2011).

Diabetes mellitus tipo I é uma doença autoimune na qual é determinada por uma combinação de fatores genéticos e ambientais. A doença é caracterizada por hiperglicemia crônica e pelo desenvolvimento de alterações vasculares. Neste tipo de diabetes há uma destruição, mediada por células T, das células β das ilhotas pancreáticas secretoras de insulina (RIBEIRO et al., 2012).

O DM tipo I pode ocorrer em qualquer idade, mas a maioria dos pacientes é diagnosticada antes dos 30 anos de idade e o processo da doença inicia-se meses a anos antes do surgimento dos sintomas clínicos (KNIP, 2012).

Knip (2012, apud ONKAMO et al., 1999) comenta que a incidência de DM tipo I dobrará entre as crianças europeias com menos de cinco anos a partir do ano de 2005 até 2020, e que o número de crianças menores de 15 anos com DM tipo I aumentará em 70% durante o mesmo período.

O DM tipo II acomete aproximadamente 90% a 95% dos diabéticos e pode ser desencadeado por vários fatores, como obesidade, dieta hipercalórica e sedentarismo. O DM II é caracterizada por uma combinação de resistência à insulina e uma resposta compensatória a secreção de insulina inadequada, o que leva a uma hiperglicemia característica. Atualmente, observa-se que o tipo II altera os níveis séricos de vários aminoácidos que podem contribuir para as perturbações na secreção e ação de insulina (RIBEIRO et al., 2012).

O DM tipo II compõe uma grande proporção do total de portadores da doença em nível mundial e mais alarmante ainda, com uma tendência na queda na idade dos pacientes portadores. Além disso, o DM tipo II é frequentemente assintomático em sua fase inicial e pode permanecer sem diagnóstico durante vários anos, e, muitos pacientes são diagnosticados somente após surgimento dos sintomas das complicações. As complicações do DM tipo II são uma das principais causas para a morbidade e a redução da expectativa de vida. Têm sido demonstrados que pessoas adultas com diabetes têm maiores taxas de derrame e morte por doença cardíaca (THOOPPUTRA, 2012).

O tratamento do diabetes, tanto o tipo I, quanto o tipo II é complexo e exige, além do controle glicêmico, uma série de intervenções para melhora dos resultados. Diabetes exige cuidados, manutenção contínua com atendimento médico, educação permanente para o autocuidado e suporte para prevenir as complicações agudas e reduzir o risco de complicações em longo prazo (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2011).

3.3 - CICATRIZAÇÃO E DIABETES

Indivíduos diabéticos exibem uma deficiência documentada na cicatrização de feridas agudas. Além disso, estão propensos a desenvolver úlceras do pé diabético, que são

*Onkamo P, et al., Worldwide increase in the incidence of type I diabetes—the analysis of the data on published incidence trends. *Diabetologia*, v. 42, p. 1395–1403. 1999.

estimadas para ocorrer em 15% de todas as pessoas com diabetes. Úlceras do pé diabético são uma complicação grave do diabetes, e precedem 85% de todas as amputações dos membros inferiores relacionadas a esta doença (BREM, TOMIC-CANIC, 2007).

Segundo Vieira-Santos, et al., (2008) pé diabético é uma infecção, ulceração e ou destruição dos tecidos profundos associadas a anormalidades neurológicas e vários graus de doença vascular periférica nos membros inferiores.

A cicatrização prejudicada de feridas cutâneas em pessoas com diabetes envolve múltiplos mecanismos fisiopatológicos complexos. Tanto as úlceras do pé diabético, como a doença de estase venosa e úlceras de pressão, não curadas, são sempre acompanhadas por hipóxia (LE, 2011). Uma situação de hipóxia prolongada é sustentada tanto pela perfusão quanto pela angiogênese insuficientes, sendo prejudiciais para a cicatrização de feridas. A hipóxia pode amplificar a resposta inflamatória inicial, prolongando assim a lesão ao aumentar os níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) (GUO, DIPIETRO, 2010, BERMUDEZ et al., 2011, KOLLURU, 2011, LE, 2011).

A hiperglicemia também pode contribuir com o estresse oxidativo, quando a produção de ROS excede a capacidade anti-oxidante. A formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs), e da interação com os seus receptores (RAGE) na hiperglicemia estão associados com a dificuldade de cura de feridas em ratos diabéticos. Bem como, altos níveis de metaloproteases (MMPs) que são uma característica de úlceras do pé diabético, e os níveis de MMPs no fluido de feridas crônicas são quase 60 vezes maiores do que em feridas agudas, contribuindo ainda mais para a destruição do tecido e impedindo a cura (GUO, DIPIETRO, 2010, BERMUDEZ et al., 2011, KOLLURU, 2011, LE, 2011).

Muitas funções celulares desreguladas estão envolvidas na progressão das feridas diabéticas, tais como, deficiência da resposta imune das células T, defeitos na quimiotaxia de leucócitos, fagocitose e capacidade bactericida, devido a diminuição da produção de quimiocinas, fatores de crescimento e o atraso na infiltração de células inflamatórias.

Nas feridas de pacientes diabéticos ocorre disfunção dos fibroblastos e de células epiteliais. As alterações em várias quimiocinas e fatores de crescimento em feridas diabéticas levam a dificuldade na angiogênese, na formação da matriz e reepitelização (GUO, DIPIETRO, 2010, BERMUDEZ et al., 2011, KOLLURU, 2011, LE, 2011).

Dessa forma, o indivíduo diabético fica propenso à infecção e dificuldade de cura em feridas (GUO, DIPIETRO, 2010, BERMUDEZ et al., 2011, KOLLURU, 2011, LE, 2011).

Em relação à angiogênese inadequada, vários estudos que investigaram os mecanismos pelo qual ocorre uma diminuição da restauração da vasculatura em feridas em pacientes diabéticos, e constataram que há mobilização de células precursoras endoteliais (ECPs) deficientes, e que o nível do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) também é diminuído no diabetes (BREM, TOMIC-CANIC, 2007).

Durante as fases posteriores da cicatrização em diabéticos, a persistência de células inflamatórias nas feridas também resultam em danos de forma persistente, devido ao aumento da expressão de interleucina-1b (IL-1b), do fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e das metaloproteases (MMPs) (GUO, DIPIETRO, 2010, BERMUDEZ et al., 2011, KOLLURU, 2011, LE, 2011).

A neuropatia, provavelmente, também contribui para a dificuldade de cura de feridas em diabéticos. Os neuropeptídeos, tais como o fator de crescimento do nervo, a substância P, a calcitonina e peptídeos são relevantes para a cicatrização de feridas, pois promovem a quimiotaxia de células, induzem a produção de fator de crescimento, e estimulam a proliferação de células. Uma diminuição de neuropeptídeos tem sido associada com a formação de úlceras de pé diabético. Além disso, os nervos sensoriais são importantes moduladores nos mecanismos de defesa, resultando em redução da infiltração de leucócitos (GUO, DIPIETRO, 2010, LE, 2011).

Outros aspectos da cicatrização de feridas em pacientes diabéticos incluem a proliferação celular reduzida no tecido da ferida, diminuição do início da diferenciação dos miofibroblastos, e aumento dos níveis de apoptose inadequado durante as fases do processo de cura. Dificuldade de migração de células epiteliais e diminuição da migração e proliferação de fibroblastos (GUO, DIPIETRO, 2010, BERMUDEZ et al., 2011, KOLLURU, 2011, LE, 2011).

Portanto, podemos resumir que a deficiência de cura que ocorre em indivíduos com diabetes envolve hipóxia, disfunção dos fibroblastos e células epiteliais, diminuição da angiogênese e neovascularização, altos níveis de metaloproteases, danos causados por ROS e AGEs, diminuição da resistência imunológica do hospedeiro e neuropatia (GUO, DIPIETRO, 2010, LE, 2011).

3.4 – PRÓPOLIS

O própolis é uma substância resinosa, produzida pelas abelhas a partir da coleta de substâncias secretadas pelas plantas. É encontrada nas colmeias, onde é responsável pela impermeabilização, isolamento térmico, vedação e no combate contra as infecções fúngicas e bacterianas (MANARA et al., 1999, LENNAN et al., 2008).

Esse própolis recolhido da colmeia de abelhas apresenta em sua composição básica, cerca de 50% de resinas vegetais, 30% de cera de abelha, 10% de óleos essenciais, 5% de pólen e 5% de detritos de madeira e terra. Estes valores se referem à espécie *Apis mellifera* L., cujo própolis é a mais estudada entre as abelhas (MENEZES, 2005).

Mais recentemente, o própolis, ficou conhecido por ter uma vasta gama de atividades biológicas, tais como, antimicrobiana, anti-inflamatória, antioxidante, hepatoprotetora, atividades antitumorais e no tratamento de lesões cutâneas tais como queimaduras e feridas (MANARA et al., 1999, MENEZES, 2005, MOURA, 2011;).

A composição do própolis é determinada principalmente pelas características fitogeográficas existentes ao redor da colmeia. Entretanto, a composição do própolis também varia sazonalmente em uma mesma localidade. Variações na composição também foram observadas entre amostras de própolis coletadas em uma mesma região, por diferentes raças de *A. mellifera* (MENEZES, 2005, MOURA, 2011). Contendo mais de 200 constituintes, os principais compostos químicos isolados do própolis até o momento podem ser organizados em alguns grupos principais como: ácidos e ésteres alifáticos, ácidos e ésteres aromáticos, açúcares, álcoois, aldeídos, ácidos graxo, aminoácidos, esteróides, cetonas, charconas e di-hidrocharconas, flavonóides (flavonas, flavonóis e flavononas), Terpenóides, Proteínas, vitaminas B1, B2, B6, C, E, bem como diversos minerais. Sendo os flavonóides os mais importantes (MENEZES, 2005, NAJAFI, 2007).

O própolis é muito procurado em alguns países para o tratamento de uma gama de doenças humanas, e para fins cosméticos. O uso medicinal do própolis inclui: o tratamento de transtornos do sistema cardiovascular e sangue (anemia), aparelho respiratório (por diversas infecções), atendimento odontológico, regeneração dos tecidos em dermatologia (úlceras, excema, cicatrização de feridas - especialmente feridas de queimaduras, micoses, infecções das mucosas e lesões), tratamento de câncer, melhora do sistema imunológico,

distúrbios do trato digestivo (úlceras e infeções), proteção do fígado e tantas outras aplicações (NAJAFI, 2007).

4 - MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 – ANIMAIS

Para a realização deste estudo foram utilizados trinta e dois ratos (*Rattus norvegicus albinus*), da linhagem Wistar, macho, sadios ao exame clínico, pesando entre 220g e 290g, com aproximadamente três meses de idade e provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG). Os animais foram pesados em uma balança analógica Marte®, separados em dois grupos e alojados em gaiolas plásticas Beiramar® para ratos, com quatro animais por gaiola, mantidos no Biotério Central da UNIFAL-MG em fotoperíodo natural de 12 horas, temperatura 22°C e umidade aproximadamente de 55%. Aos animais foram fornecidos água e ração sólida para animais da marca Purina® ad libitum. Antes do início da parte experimental os animais ficaram um período de quatro dias em observação. Neste estudo os animais foram tratados segundo os princípios éticos da experimentação animal de acordo com a sociedade brasileira de ciências de animais de laboratório (SBCAL) com aprovação do “Comitê de ética em pesquisa animal” da UNIFAL-MG, registrado sob o nº 386/2012.

4.2 - GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram divididos em dois grupos, sendo um grupo composto por 24 animais diabéticos induzidos e outro grupo composto por 8 animais não diabéticos, com a seguinte denominação:

- a) Grupo 1 – diabéticos;
- b) Grupo 2 - não diabéticos.

Os grupos foram subdivididos como se segue:

Grupo 1 em subgrupo 1A com 4 animais que foram eutanasiados após 4 dias do procedimento cirúrgico e subgrupo 1B com 4 animais que foram eutanasiados após 10 dias do procedimento cirúrgico.

Grupo 2 em subgrupo 2A com 4 animais que foram eutanasiados após 4 dias do procedimento cirúrgico e subgrupo 2B com 4 animais que foram eutanasiados após 10 dias do procedimento cirúrgico.

3.5 - INDUÇÃO DO DIABETES

Na pré-indução do diabetes, correspondente ao dia que antecede a indução, todos os 32 animais tiveram o peso corporal e os índices glicêmicos registrados, em seguida iniciou-se o jejum alimentar por um período de 12 horas com fornecimento de água *ad libitum*.

Os valores glicêmicos foram obtidos seccionando-se a extremidade da cauda do animal e depositando uma gota de sangue diretamente sobre a célula da tira reagente para glicemia [®]G-TECH FREE 1, sendo o valor da glicemia registrado com glicosímetro portátil também de marca [®]G-TECH FREE 1.

Os animais do Grupo 1 tiveram o diabetes experimental induzido pela administração de uma solução aquosa de aloxana (5,6 Dioxiuracil monohidrato, Aloxan-Sigma - St. Louis - USA) diluída em solução salina de 0,9% por via intraperitoneal na dose única de 120mg/kg de peso corporal, utilizando-se seringas com agulhas de calibre 13 x 4,5mm.

Foi diluída a quantidade de aloxana (120mg/kg) correspondente ao peso do animal em 0,5ml de solução fisiológica a 0,9% para aplicação intraperitoneal.

Foram considerados diabéticos os animais que apresentaram valores glicêmicos superiores a 200mg/dl (CARVALHO, CARVALHO, FERREIRA, 2003, LERCO, et al., 2003).

Os animais do Grupo 2 receberam 0,5ml de solução salina a 0,9% por via intraperitoneal utilizando-se seringas com agulhas de calibre 13 x 4,5mm.

Decorridas 4 horas da administração da aloxana, os animais receberam glicose hipertônica a 10% na água de beber, durante um período de 24 horas e após esse período, retornou-se com a alimentação e a hidratação normais.

Os animais submetidos ao diabetes experimental foram observados clinicamente por um período de 10 dias após a indução, quando a dosagem da glicemia foi medida para confirmação do desenvolvimento da doença.

4.4 - PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Após os 10 dias de indução do diabetes e da aplicação de solução salina a 0,9%, foram realizadas feridas no dorso dos animais, sob anestesia.

A anestesia foi realizada com a administração, por via intraperitoneal, de 2,2,2 Tribromoethanol (TBE) na dose de 0,5g/kg de peso do animal diluído em solução salina a

0,9%. O TBE foi aplicado de forma independente, com a utilização de seringas com agulhas de 13 x 4,5mm. Esse procedimento anestésico foi utilizado neste estudo quando se fez necessário.

Os animais foram tricotomizados manualmente, delimitando uma área de 7,5 x 2,5 cm (FIGURA 1); em seguida foi realizada a antissepsia com gaze embebida em álcool a 70%, seguindo-se, com o auxílio de um instrumento de biopsia Punch de 5mm de diâmetro, a realização de 3 lesões circulares com profundidade suficiente para a remoção do epitélio (FIGURA 2).

A indução das lesões no dorso dos animais seguiu o seguinte padrão: a primeira lesão foi a aproximadamente 3cm da base das orelhas, no sentido céfalo-caudal, a segunda lesão e a terceira lesão foram realizadas respeitando um limite mínimo de 2cm entre as lesões e a linha média no dorso, conforme Figura 3. Após a confecção das feridas os animais foram alojados individualmente nas suas caixas.

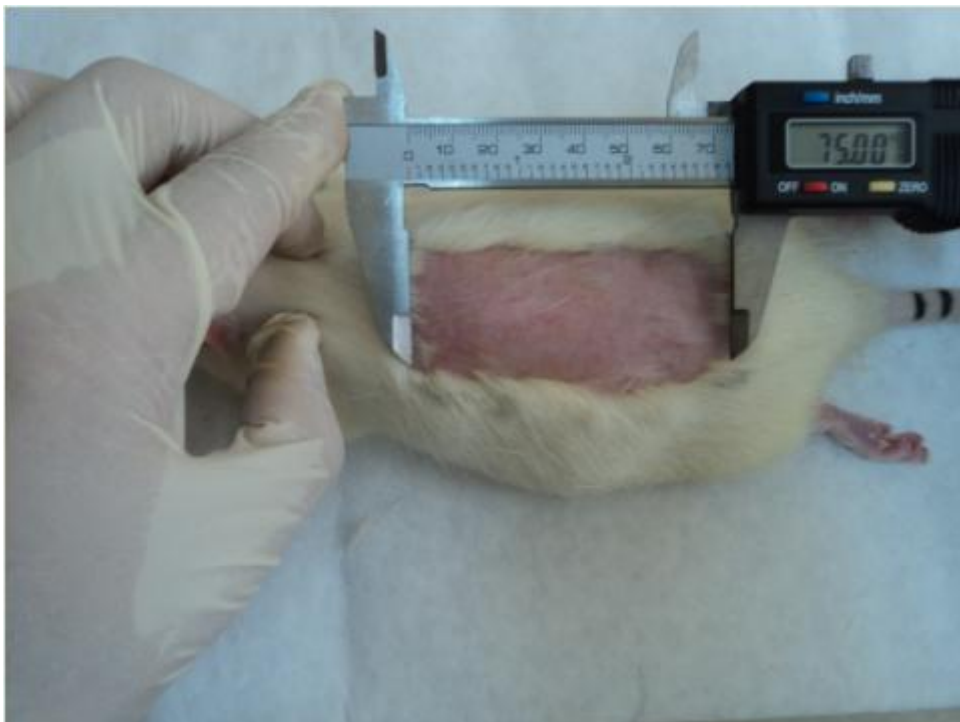


Figura 1 - Mensuração da área do dorso do animal após a tricotomia.
Fonte: Do autor



Figura 2 - Representação das lesões no dorso dos animais.
Fonte: Do autor.



Figura 3 - Realização das lesões cutâneas com Punch de 5mm.
Fonte: Do autor.

4.5 - TRATAMENTO DAS FERIDAS

Todos os animais receberam simultaneamente, após a cirurgia, tratamento tópico com pomada de própolis comercial a 10% adquirida em farmácia de manipulação proveniente de abelhas da espécie *Apis mellifera*, tratamento tópico com dexametasona a 0,1% (acetato de dexametasona 1mg/excipientes q.s.p...1g), da marca GERMED®, adquirida em farmácia comercial e tratamento tópico com solução salina a 0,9%, todos cobrindo a

totalidade da ferida (FIGURA 4). Estes procedimentos foram realizados diariamente por volta das 10h durante o período experimental.



Figura 4. Representação das feridas e do tipo de tratamento.
Fonte: Do autor.

4.6 ANÁLISE DO PRÓPOLIS

4.6.1 Obtenção do extrato de própolis

Foi utilizado 5g da pomada de própolis, passando por um processo de extração do própolis com a utilização de 500mL de solução hidroalcoólica 95%. A extração foi feita numa temperatura ambiente durante 12 horas sob agitação. Após a extração, a amostra foi filtrada e o solvente foi rotaevaporado. O pó obtido foi armazenado em tubo de ensaio estéril com rosca e mantido em refrigerador, a temperatura de +4°C a +8°C.

4.6.2 Teor de flavonóides totais

A concentração de flavonóides totais foi determinada de acordo com Brasil (2003). Para determinar o teor de flavonóides totais nas amostras, inicialmente foi preparada uma curva de concentração padrão com quercetina dihidratada, dessa forma, em tubos de ensaio foram adicionados alíquotas de 0,5 a 2,5ml de solução de quercetina a 50mg/l, 0,5ml solução de cloreto de alumínio a 5%, 1,0ml de solução de acetato de sódio a 0,1mol/l e de 6 a 8,5ml de metanol. Para o preparo das amostras foram misturados 1,0mL da solução de

própolis, 0,5mL de solução de cloreto de alumínio, 1,0mL de solução de acetato de sódio e 7,5mL de metanol. Decorridos 40 minutos a 25°C temperatura ao abrigo da luz, foi tomada a leitura de cada solução, em espectrofotômetro, calibrado em 100% de transmitância, utilizando o branco a 425nm. E de acordo com análise bioquímica realizada no laboratório de bioquímica do Instituto de Ciências Biomédicas da UNIFAL, o extrato de própolis analisado revelou ter: 0,41% de flavonóides totais.

4.6.3 Teor de fenóis totais

A concentração de compostos fenólicos foi determinada de acordo com Brasil (2003). Para determinar o teor de fenóis totais presentes nas amostras, inicialmente foi preparada uma curva padrão com o ácido gálico, dessa forma, em erlenmeyers foram adicionados de 0,5 a 4,5ml de solução de ácido gálico a 50mg/ml, 4ml de reativo fenol Folin-Ciocalteau, 6ml de solução de carbonato de sódio 20% e aproximadamente 40ml de água destilada. Para o preparo das amostras foram misturados, 1ml de solução de própolis, 60ml de água destilada, 5ml de reativo fenol Folin-Ciocalteau, 10ml de solução de carbonato de sódio e completado para o volume de 100ml com água destilada. Decorridos 2 horas, a leitura foi tomada em espectrofotômetro, calibrado em 100% de transmitância, utilizando o branco a 760nm. E de acordo com análise bioquímica realizada no laboratório de bioquímica do Instituto de ciências biomédicas da UNIFAL, o extrato de própolis analisado revelou ter 7,11% de fenólicos totais.

4.7 - PROCEDIMENTOS UTILIZADOS PARA EUTANASIA DOS ANIMAIS E AVALIAÇÃO DAS FERIDAS

Após o período de 4 dias da cirurgia os animais do subgrupo 1A e do subgrupo 2A foram eutanasiados, e após o período de 10 dias da cirurgia os animais do subgrupo 1B e subgrupo 2B também foram eutanasiados.

Para a eutanásia os animais foram submetidos à administração, por via intraperitoneal, de 2,2,2 Tribromoethanol (TBE) na dose de 1,5g/kg de peso do animal diluído em solução salina a 0,9%.

A lesão foi mensurada e o tecido da área correspondente à lesão foi excisionado com a utilização de uma lâmina de bisturi nº15 montada em um cabo de bisturi nº3. A amostra foi removida com um formato quadrangular para preservar 1cm de margem livre em todo o contorno da lesão. A amostra foi fixada em paraformaldeído tamponado com pH 7,4 por 48 horas. Durante a macroscopia a amostra foi seccionada em partes iguais para que os cortes histológicos efetuados correspondessem sempre à região mediana da lesão e no mesmo plano anatômico do animal.

4.8 - MEDIÇÕES DA CONTRAÇÃO DA FERIDA

A contração da ferida foi avaliada medindo-se a área da ferida pela aferição dos diâmetros maior e menor, com auxílio de um paquímetro digital JOMARCA®, com medição precisa de 0,01mm. Foram tomadas essas medidas logo após a indução cirúrgica da ferida e no dia da morte do animal, no 4º dia para os subgrupos 1A e 1B e no 10º dia para os subgrupos 2A e 2B.

Utilizou-se a equação matemática proposta por Prata, et al., (1988), para obtenção da área:

$$A: \pi.R.r$$

Onde "A" representa a área, "R" o raio maior e "r" o raio menor da ferida. O cálculo do percentual de contração foi expresso através da equação matemática sugerida por Ramsey et al., (1995), onde W_o representa a área inicial da ferida, W_i área final da ferida:

$$\% \text{ de contração} = 100. [(W_o - W_i)/W_o]$$



Figura 5. Mensuração do diâmetro das lesões cutâneas.
Fonte: Do autor.

4.9 – MICROSCOPIA

Após a fixação, as amostras foram desidratadas em sequência gradativa de álcool (70%, 90%, 95%, 100%), diafanizadas em xilol e incluídas em blocos de parafina. Os blocos foram submetidos a cortes de 4 μ m de espessura preparando-se quatro lâminas com dois cortes em cada uma, que foram coradas pelo método de hematoxilina e eosina (HE), com o objetivo de visualizar a morfologia geral, a inflamação e principalmente o reparo.

Os critérios utilizados na análise microscópica foram aplicados para o infiltrado inflamatório, o tecido de granulação e a reepitelização. A análise microscópica desses fenômenos foi qualitativa, global e subjetiva e considerou a presença e a intensidade desses fenômenos, comparativamente entre os grupos experimentais. Esses fenômenos foram posteriormente quantificados e graduados em ausente (0), discreto (1), moderado (2) e intenso (3) e foram tabulados com o objetivo de gerar dados para confecção de tabelas, para melhor análise comparativa entre os grupos experimentais deste estudo e com outros trabalhos de metodologias semelhantes (FIGURA 6).

Espécimes	Grupos Experimentais											
	Controle				Própolis				Dexametasona			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Infiltrado Inflamatório MN												
Infiltrado Inflamatório PMN												
Tecido de Granulação												
Reepitelização												

Figura 6 - Modelo de tabela para preenchimento dos dados obtidos na análise microscópica.

Fonte: Do autor

5 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

O estudo de todas as variáveis foi realizado através da técnica de análise de variância em esquema fatorial, complementado com análise das médias significativas pelo teste Tukey. Todos os testes foram feitos com 5% de significância. Todos os testes foram realizados pelo programa estatístico Sisvar versão 5.1.

6 - RESULTADOS

Dos 24 animais submetidos à indução do diabetes experimental, 15 (62,5%) apresentaram valores glicêmicos inferiores ao valor estabelecido de 200mg/dl, padronizado para a constatação do diabetes, sendo então descartados, 9 (37,5%) apresentaram-se dentro dos critérios estabelecidos para o diabetes com glicemia superior a 200mg/dl, além de sinais clínicos, tais como, perda de peso, polidipsia e poliúria observados no decorrer do experimento. Um animal com diabetes (4,1%) morreu durante a experimentação e assim o Grupo 1 contou com 8 animais.

No dia anterior ao protocolo de indução do diabetes, os animais foram pesados e tiveram os valores glicêmicos registrados. Isso possibilitou tanto o cálculo da dosagem da aloxana quanto à confirmação do diabetes induzido (TABELAS 1 e 2).

Na tabela 1, podemos observar que a média de glicemia dos animais do Grupo 1 pós-indução foi de 444,5mg/dl (DP= 51,10), enquanto que os animais do Grupo 2 obtiveram média de glicemia de 117,12mg/dl (DP= 17,48).

Tabela 1. Taxa de variação de glicemia dos grupos 1 e 2 na pré-indução e pós-indução do diabetes

	GRUPO 1		GRUPO 2	
	Glicemia* Pré-indução	Glicemia* Pós-indução	Glicemia* Pré-indução	Glicemia* Pós-indução
R1	129	470	111	129
R2	116	443	123	118
R3	123	539	119	74
R4	119	387	126	129
R5	116	380	127	127
R6	125	416	113	115
R7	112	496	119	114
R8	120	425	121	131
Média	120	444,5	119,87	117,12
±Desvio Padrão	±5,14	±51,10	±5,32	±17,48

*miligramas de glicose por decilitro de sangue.

Na Tabela 2 observamos que a média de peso dos animais do Grupo 1 foi menor após a indução do diabetes, enquanto que no Grupo 2 a média de peso após a indução também foi maior.

Tabela 2. Taxa de variação de peso dos grupos 1 e 2 na pré-indução e pós-indução do diabetes.

	GRUPO 1		GRUPO 2	
	Peso* Pré-indução	Peso* Pós-indução	Peso* Pré-indução	Peso* Pós-indução
R1	259	223	288	290
R2	295	265	273	305
R3	259	231	260	304
R4	289	263	245	280
R5	266	257	256	267
R6	265	278	225	230
R7	275	250	232	255
R8	290	268	250	240
Média	274,75	254,375	253,625	271,375
± Desvio Padrão	±13,75	±17,63	±19,29	±26,45

* peso em quilogramas.

Na Tabela 3, ao avaliar a contração das lesões cutâneas dos grupos, em ambos os períodos, podemos observar que a porcentagem de contração da lesão foi sempre maior nos animais tratados com própolis, seguido pelos tratados com dexametasona e solução salina ($p=0,03$).

Tabela 3. Média de contração das lesões cutâneas dos grupos 1 e 2, conforme os tratamentos, grupos e períodos.

Períodos	GRUPO 1		GRUPO 2	
	4 dias	10 dias	4 dias	10 dias
Salina	20,41 ±3,77 ^a	84,38 ±3,22 ^c	25,92 ±2,71 ^e	88,80 ±2,9 ^g
Dexametasona	33 ±6,33 ^b	91,20 ±2,39 ^d	37,41 ± 5,6 ^f	94,99 ±0,86 ^h
Própolis	34,99 ±4,94 ^b	93,18 ±1,44 ^d	40,16 ±6,15 ^f	95,98 ±0,73 ^h

Os resultados são expressos como médias e ± desvio padrão de 8 animais por grupo. Foi utilizado análise de variância em esquema fatorial e teste tukey. Todos os testes foram feitos com 5% de significância. (a-b) indicam diferenças estatisticamente significativas entre as formas de tratamento no grupo 1 no período de 4 dias. (c-d) indicam diferenças estatisticamente significativas entre as formas de tratamento no grupo 1 no período de 10 dias. (e-f) indicam diferenças estatisticamente significativas entre as formas de tratamento no grupo 2 no período de 4 dias. (g-h) indicam diferenças estatisticamente significativas entre as formas de tratamento no grupo 2 no período de 10 dias

Em relação ao infiltrado de macrófagos (M ϕ), conforme mostrado na Tabela 4, a média de infiltrado de MN no Grupo 1 foi maior em relação ao Grupo 2, no período de 10 dias ($p=0,03$).

Conforme observado ainda na Tabela 4, no Grupo 2, no período de 4 dias, com relação ao infiltrado de macrófagos, podemos observar que a média do infiltrado dos animais tratados com própolis foi de 1,72 ($p=0,02$), enquanto que nos tratados com dexametasona a média foi de 1,47 e nos tratados com solução salina a média foi de 1,40.

Tabela 4. Média do infiltrado mononuclear (M ϕ) de lesões cutâneas, conforme os grupos e períodos.

Períodos	GRUPO 1		GRUPO 2	
	4 dias	10 dias	4 dias	10 dias
Salina	1,31 \pm 0,18 ^b	1,22 \pm 0 ^b	1,40 \pm 0,2 ^b	0,7 \pm 0 ^a
Dexametasona	1,31 \pm 0,18 ^b	1,22 \pm 0 ^b	1,47 \pm 0,31 ^b	0,7 \pm 0 ^a
Própolis	1,38 \pm 0,2 ^b	1,31 \pm 0,18 ^b	1,72 \pm 0,16 ^c	0,7 \pm 0 ^a

Os resultados são expressos como médias e \pm desvio padrão de 8 animais por grupo. Foi utilizado análise de variância em esquema fatorial e teste tukey. Todos os testes foram feitos com 5% de significância. (a-b) indicam diferenças estatisticamente significativas entre os períodos e grupos. (a-c) indicam diferenças estatística significativas entre os tratados com própolis, no grupo 2 entre os períodos. (b-c) indicam diferenças estatisticamente significativas entre as formas de tratamento no grupo 2 no período 4 dias. (a) indica diferença estatística não significativa entre as formas de tratamento no grupo 2 no período de 10 dias.

Podemos observar na Tabela 5, que a média do infiltrado de neutrófilos dos animais tratados com própolis foi de 1,22 ($p=0,0036$), enquanto que a média dos tratados com dexametasona foi de 1,31, e a média dos tratados com solução salina foi de 1,49.

Tabela 5. Média de infiltrado de polimorfonuclear (PMN) de lesões cutâneas, conforme os tratamentos, grupos e períodos.

Períodos	GRUPO 1		GRUPO 2	
	4 dias	10 dias	4 dias	10 dias
Salina	1,49 \pm 0,18 ^c	0,7 \pm 0 ^d	1,40 \pm 0,18 ^b	0,7 \pm 0 ^d
Dexametasona	1,31 \pm 0,18 ^b	0,7 \pm 0 ^d	1,22 \pm 0 ^a	0,7 \pm 0 ^d
Própolis	1,22 \pm 0 ^a	0,7 \pm 0 ^d	1,22 \pm 0 ^a	0,7 \pm 0 ^d

Os resultados são expressos como médias e \pm desvio padrão de 8 animais por grupo. Foi utilizado análise de variância em esquema fatorial e teste tukey. Todos os testes foram feitos com 5% de significância. (c-b-a) indicam diferenças estatisticamente significativas entre as formas de tratamento no grupo 1 no período de 4 dias. (d) indica diferença estatística não significativa entre as formas de tratamento no grupo 1 e grupo 2 no período de 10 dias. (b-a) indica diferença estatística significativa entre as formas de tratamento no grupo 2 no período de 4 dias e entre os grupos no período de 4 dias.

Com relação à média de formação do tecido de granulação, como apresentado na Tabela 6, no Grupo 1 no período de 10 dias, os animais tratados com própolis apresentaram média de 1,87 ($p=0,01$), enquanto que os tratados com dexametasona tiveram média de 1,58 e os tratados com solução salina tiveram média de 1,58.

Tabela 6. Média de formação do tecido de Granulação dos animais, conforme os tratamentos, grupos e períodos.

Períodos	GRUPO 1		GRUPO 2	
	4 dias	10 dias	4 dias	10 dias
Controle	1,22 ±0 ^a	1,58 ±0 ^b	1,22 ±0 ^a	1,87 ±0 ^c
Dexametasona	1,40 ±0,18 ^a	1,58 ±0 ^b	1,31 ±0,18 ^a	1,87 ±0 ^c
Própolis	1,36 ±0,2 ^a	1,87 ±0 ^c	1,31 ±0,18 ^a	1,87 ±0 ^c

Os resultados são expressos como médias e \pm desvio padrão de 8 animais por grupo. Foi utilizado análise de variância em esquema fatorial e teste Tukey. Todos os testes foram feitos com 5% de significância. (a) indica diferença estatística não significativa entre as formas de tratamento no grupo 1 e grupo 2 no período de 4 dias. (b-c) indicam diferenças estatisticamente significativas entre as formas de tratamento no grupo 1 no período de 10 dias, e entre os grupos no período de 10 dias. (d) indica diferença estatística não significativa entre as formas de tratamento no grupo 2 no período 10 dias.

Com relação à reepitelização, como apresentado na Tabela 7, os animais do Grupo 1 no período de 10 dias e tratados com própolis, apresentaram média de 1,72 ($p=0,01$), enquanto que a média no Grupo 2, no mesmo período e tratamento foi de 1,58.

Tabela 7. Média de formação de reepitelização dos animais, conforme os tratamentos, grupos e períodos.

Períodos	GRUPO 1		GRUPO 2	
	4 dias	10 dias	4 dias	10 dias
Controle	1,22 ±0 ^a	1,65 ±0 ^b	1,22 ±0 ^a	1,58 ±0 ^b
Dexametasona	1,22 ±0 ^a	1,58 ±0 ^b	1,22 ±0 ^a	1,65 ±0,16 ^b
Própolis	1,22 ±0 ^a	1,72 ±0,16 ^c	1,22 ±0 ^a	1,58 ±0 ^b

Os resultados são expressos como médias e \pm desvio padrão de 8 animais por grupo. Foi utilizado análise de variância em esquema fatorial e teste tukey. Todos os testes foram feitos com 5% de significância. (a) indica diferença estatística não significativa entre as formas de tratamento no grupo 1 e grupo 2 no período de 4 dias. (b-c) indicam diferenças estatisticamente significativas entre as formas de tratamento no grupo 1 no período de 10 dias e entre os grupos no período de 10dias. (b) indica diferença estatística não significativa entre as formas de tratamento no grupo 2 no período 10 dias.

Podemos observar no Grupo 1 no período de 10 dias, que a média de reepitelização dos animais tratados com própolis foi de 1,72 ($p=0,03$), enquanto que a média nos tratados com dexametasona foi 1,58 e a média dos tratados com solução salina foi de 1,65 (TABELA 7).

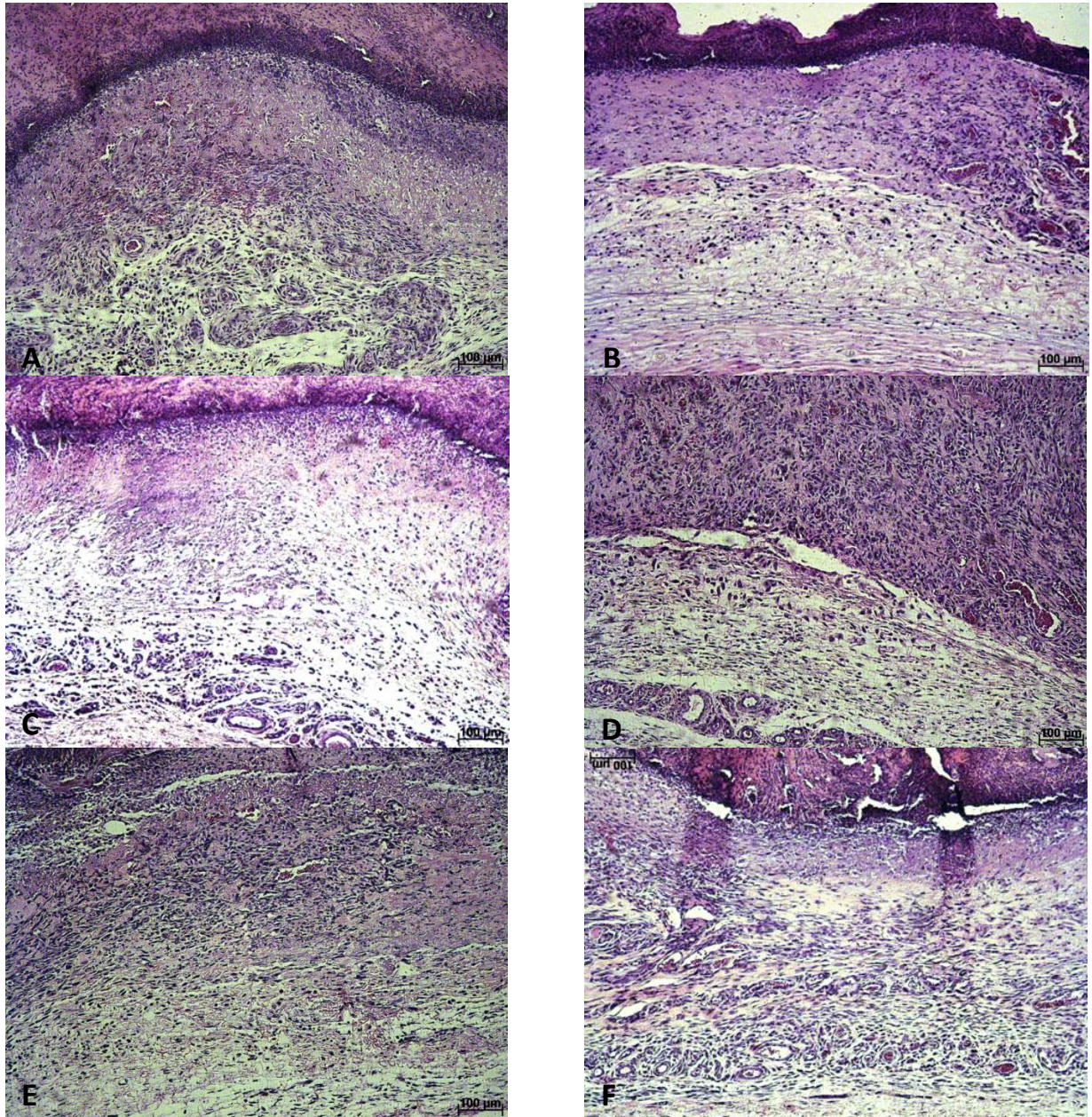


Figura 7 - Fotomicrografias representativas dos cortes histológicos das lesões cutâneas dos ratos dos Grupos 1 e 2 no período de 4 dias. (A, C, E) Cortes histológicos animais do Grupo 1, sendo (A) tratados com solução salina, (C) tratados com dexametasona e (E) tratados com Própolis. (B, D, F) Cortes histológicos dos animais do Grupo 2, sendo (B) dos animais tratados solução salina, (D) tratados com dexametasona e (F) tratados com Própolis. (HE-10X).

Fonte: Do autor.

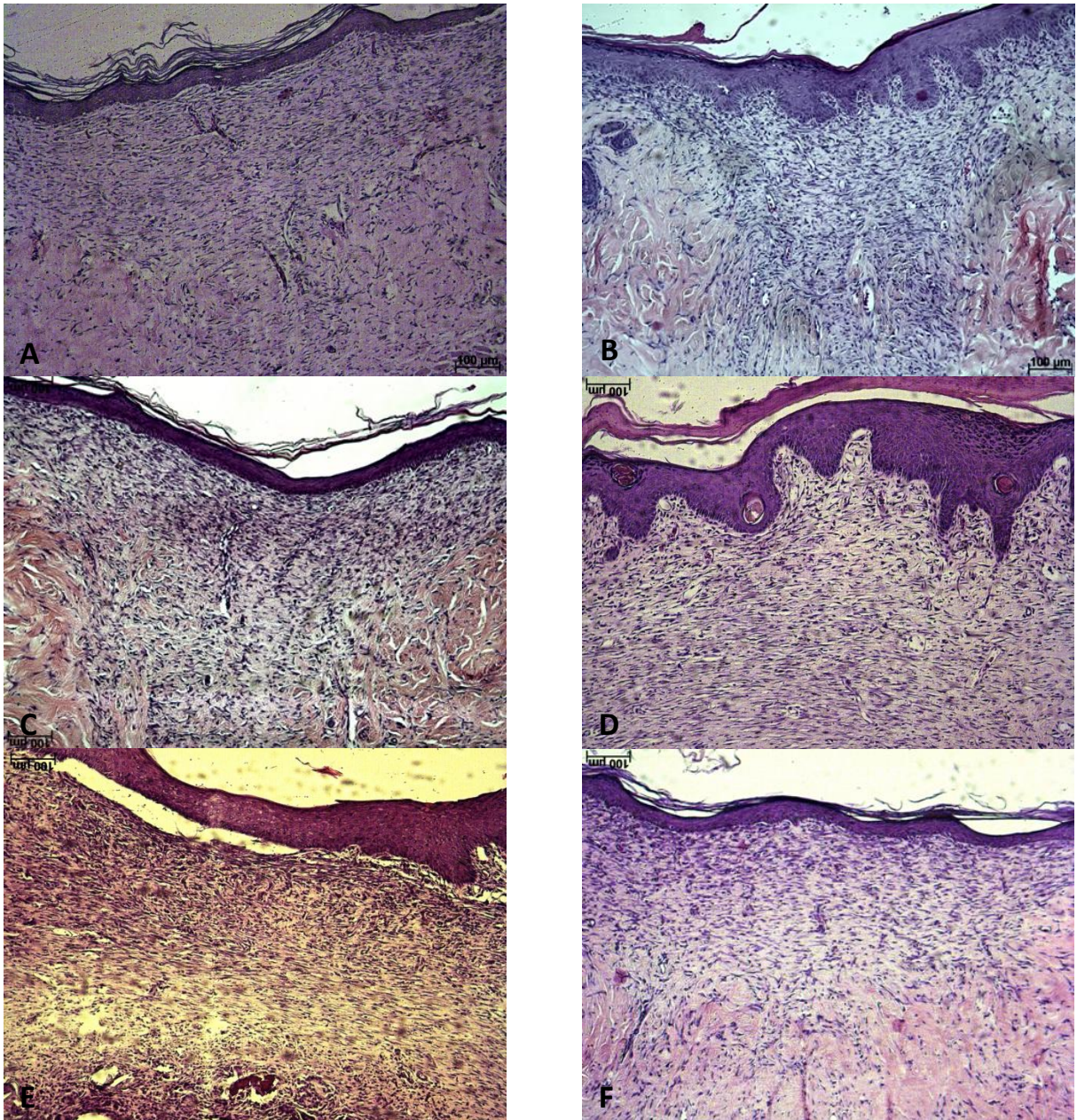


Figura 8 - Fotomicrografias representativas dos cortes histológicos das lesões cutâneas dos ratos dos Grupos 1 e 2 no período de 10 dias. (A, C, E) Cortes histológicos animais do Grupo 1, sendo (A) tratados com solução salina, (C) tratados com dexametasona e (E) tratados com Própolis. (B, D, F) Cortes histológicos dos animais do Grupo 2, sendo (B) dos animais tratados solução salina, (D) tratados com dexametasona e (F) tratados com Própolis. (HE-10X).

Fonte: Do Autor.

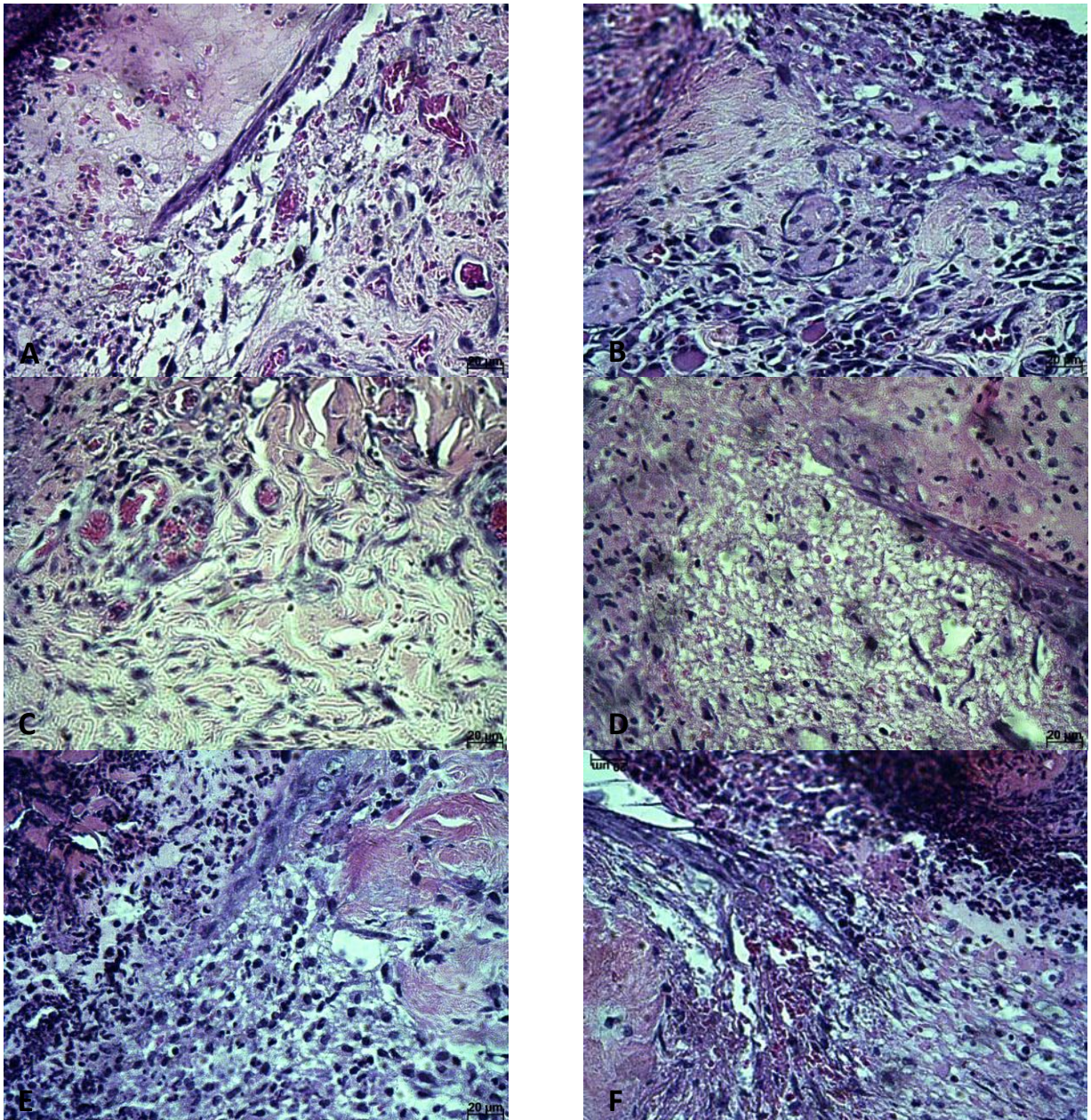


Figura 9 - Fotomicrografias representativas dos cortes histológicos das lesões cutâneas dos ratos dos Grupos 1 e 2 no período de 4 dias. (A, C, E) Cortes histológicos animais do Grupo 1, sendo (A) tratados com solução salina, (C) tratados com dexametasona e (E) tratados com Própolis. (B, D, F) Cortes histológicos dos animais do Grupo 2, sendo (B) dos animais tratados solução salina, (D) tratados com dexametasona e (F) tratados com Própolis. (HE-40X).

Fonte: Do autor.

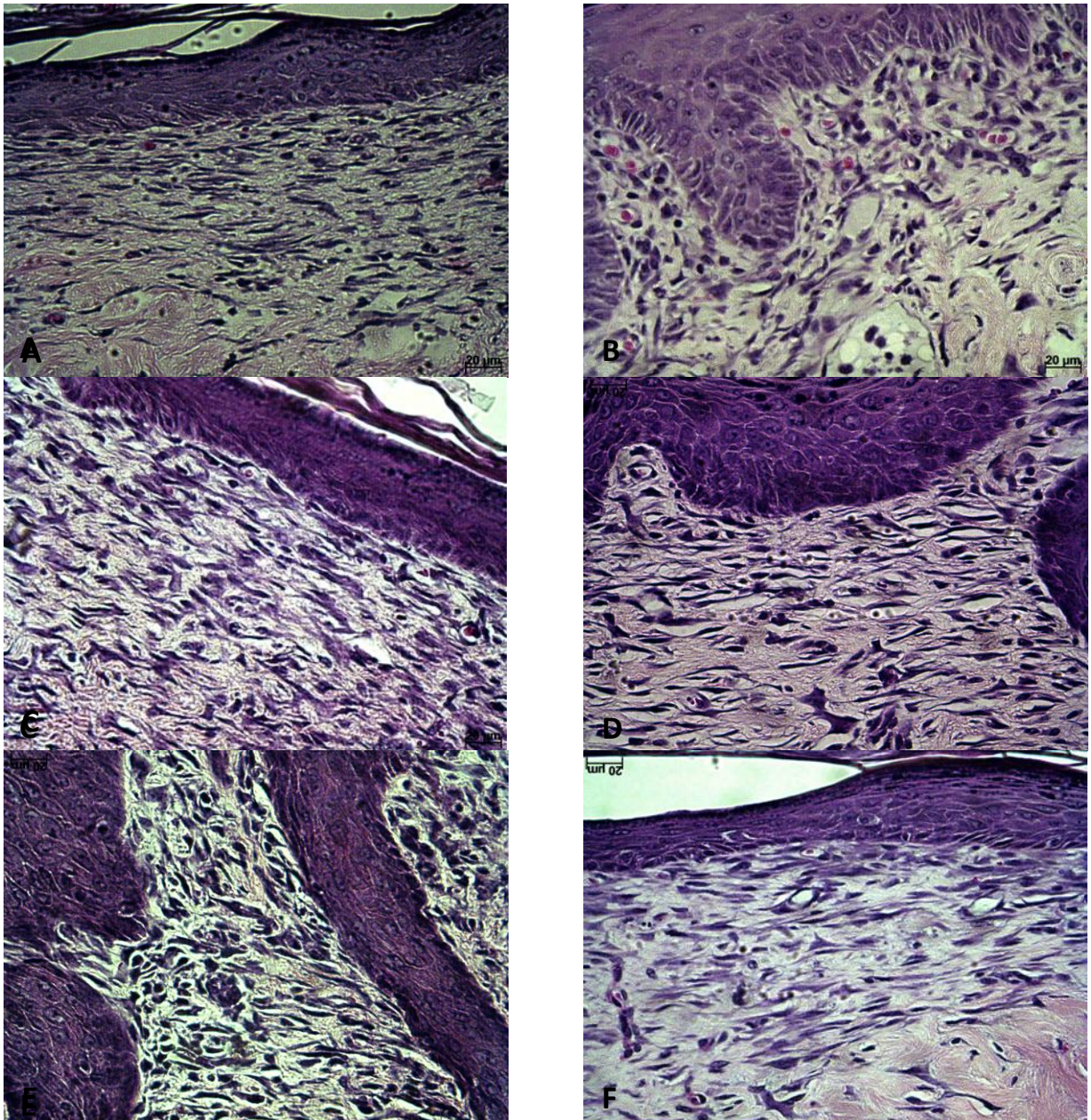


Figura 10 - Fotomicrografias representativas dos cortes histológicos das lesões cutâneas dos ratos dos Grupos 1 e 2 no período de 10 dias. (A, C, E) Cortes histológicos animais do Grupo 1, sendo (A) tratados com solução salina, (C) tratados com dexametasona e (E) tratados com Própolis. (B, D, F) Cortes histológicos dos animais do Grupo 2, sendo (B) dos animais tratados solução salina, (D) tratados com dexametasona e (F) tratados com Própolis. (HE-40X).

Fonte: Do autor.

7 – DISCUSSÃO

Indivíduos diabéticos possuem dificuldades de cicatrização de feridas por vários fatores, além disso, são propensos a desenvolver úlceras do pé diabético, estimadas para ocorrer em 15% dos diabéticos. Úlceras do pé diabético são uma complicação séria, e precedem 84% de todas as amputações de perna relacionados ao diabetes (GUO, DIPIETRO, 2010).

Úlceras do pé diabético são tipicamente feridas crônicas com dificuldades para cicatrização que ocorrem devido ao processo fisiopatológico do diabetes, que incluem isquemia, defeitos intrínsecos na angiogênese e imunidade diminuída contra a infecção. A sequência recorrente de pequenos traumas formam úlceras cutâneas mal curadas potencialmente progridem para a amputação dos membros inferiores, com consequente prejuízo na qualidade de vida e maior risco de mortalidade (NATHER, 2011).

A natureza e a dificuldade de cicatrização das feridas crônicas continuam a ser um desafio aos profissionais de saúde, pois muitas são as opções de tratamento, com resultados muito distantes do ideal. Diante disso, formas alternativas de tratamento biológico têm sido utilizadas e estão ganhando reconhecimento, como por exemplo, a utilização do mel e do própolis, que possuem efeitos biológicos capazes de melhorar a cicatrização em feridas (DENTE, 2009, ALVES et al., 2008).

Os principais compostos químicos isolados da própolis em nosso trabalho foram: os compostos fenólicos e os compostos flavonóides. Os flavonóides, por serem os mais importantes atuantes em diversos processos fisiológicos, auxiliando na absorção e na ação de vitaminas, atuando nos processos de cicatrização como antioxidantes, além de apresentarem atividade antimicrobiana e moduladora do sistema imune. E apesar de serem os componentes do própolis mais extensivamente estudados, eles não são os únicos responsáveis por suas propriedades farmacológicas (MENEZES, 2005).

Frente a essa realidade, torna-se imprescindível a melhor compreensão dos mecanismos fisiopatológicos do diabetes e de suas complicações à procura de tratamentos capazes de contribuir com as alterações endócrino-metabólicas causadas pela doença e, principalmente as lesões crônicas nos diferentes órgãos. Contudo, estudos experimentais sobre o diabetes e suas complicações têm sido extremamente necessários, justificando-se,

portanto, os vários modelos para sua indução experimental, como por exemplo, o por aloxana utilizado neste estudo (LERCO et al., 2003).

Para a indução do diabetes experimental utilizamos aloxana devido a sua capacidade de induzir DM irreversível após 24 horas de sua administração e a condição revela-se crônica por testes de laboratório depois de sete dias (CARVALHO, CARVALHO, FERREIRA, 2003). Considerando também que este modelo diabético aloxânico é reconhecido pela similaridade ao quadro diabético insulino-dependente (LENZEN, 2008). O índice de sucesso em nosso trabalho para indução de diabetes por aloxana foi de 37,5%, próximo aos índices obtidos com este método em outros estudos CARVALHO et al., (2003), LERCO et al., (2003) e CARVALHO, CARVALHO, FERREIRA, (2003) que obtiveram cerca de 40% de ratos diabéticos após aplicação de aloxana.

As perdas dos animais devido ao não desenvolvimento do diabetes ou morte durante a experimentação não interferiu na realização do que foi proposto pelos objetivos deste estudo, nem nos resultados alcançados, considerando que diferentes estudos, BITAR, AL-MULLA, (2012), BERRETTA, et al., (2012), BERMUDEZ, et al., (2011) e KHANNA, (2010) também utilizaram quatro ou três animais por grupo.

Para esse estudo utilizamos como modelo experimental, ratos machos, da linhagem Wistar, oriundos do biotério central da UNIFAL, onde também foram acomodados para a realização dos procedimentos da pesquisa. E mostrou-se de fácil manipulação para o procedimento cirúrgico e aplicação do tratamento das lesões cutâneas. Sendo também, amplamente utilizados em outros estudos experimentais de cicatrização de feridas cutâneas (OLIVEIRA, et al., 2001; GARROS, et al., 2006; ALVES, et al., 2008). Já que o que se conhece sobre a cicatrização de feridas em diabéticos foi derivado de feridas experimentais em animais (LE, et al., 2011).

A região dorsal do rato, escolhida para a realização da lesão, teve por finalidade evitar que o próprio animal conseguisse atingi-la, e por ser modelo experimental de cicatrização de ferida por segunda intenção bastante conhecido e utilizado. Quanto ao tamanho das feridas, foi utilizada a medida constante de 5mm, o que permitiu melhor acompanhamento da cicatrização, de acordo com outros autores, como MARCHINI et al., (1988) e SANCHEZ NETO et al., (1993) e a ferida foi analisada por observações macro e microscópica nos dias considerados mais significativos para o processo de cicatrização tecidual (GARROS, et al., 2006).

A confecção das feridas e as formas de tratamento basearam-se nos mesmos princípios do modelo proposto por CABRAL, et al., (2003) e RAHMANIAN-SCHWARZ et al., (2012), com a confecção de mais de uma ferida na linha média dorsal do animal, proporcionando a análise de variáveis, como por exemplo: estudos de contração e cicatrização de feridas, o estudo de curativos ou agentes tópicos para a cicatrização.

Como diversas substâncias podem modular as diferentes fases do processo de cura, incluindo a dexametasona e o própolis, optamos por uma comparação de tratamento entre essas substâncias. A dexametasona é um glicocorticoide sintético que promove uma redução na proliferação de queratinócitos bem como a angiogênese e a fibroplasia em feridas cirúrgicas. O própolis é uma substância resinosa balsâmica de consistência viscosa de cor variável e feita por abelhas (*Apis mellifera*). Os seus principais componentes químicos incluem flavonóides, que atuam como anti-oxidantes, agentes antimicrobianos e moduladores do sistema imunitário.

Na avaliação microscópica, as amostras foram processadas pelas técnicas adotadas no Laboratório de Patologia da UNIFAL-MG e coradas com hematoxilina-eosina (HE) que é universal, de uso rotineiro e eficiente na quantificação e identificação das alterações do processo cicatricial, e que se revelou suficiente neste trabalho, não havendo necessidade do uso de outros corantes ou métodos para análise (BRITO FILHO, 2006).

A contração da ferida é uma característica necessária para o processo de cura em feridas cutâneas (ARUL V., et al, 2005). Considerando que ratos diabéticos apresentam menor capacidade de cicatrização de feridas (PENG, 2011), avaliamos a taxa de contração das feridas nos ratos dos Grupos 1 e 2 em ambos os períodos (4 e 10 dias). O período de 4 dias, pelo fato de nesse período, iniciar a formação do tecido de granulação, e o período de 10 dias, pelo fato de nesse período, o leito da ferida estar totalmente preenchido pelo tecido de granulação (BALBINO, PEREIRA, CURI, 2005).

Ao observar a Tabela 3, podemos concluir que a contração das lesões cutâneas no Grupo 1 (diabéticos) em comparação às do grupo 2 (não diabéticos), foi menor em ambos os períodos e formas diferentes de tratamento. Por exemplo, ao analisarmos os grupos 1 e 2, no período de 4 dias e tratados com própolis, observamos que a porcentagem de contração no grupo 1 foi de 34,99, enquanto que no grupo 2 foi de 40,16, e essa de maior contração do grupo 2, segue-se em ambos os períodos e formas de tratamento. Contudo, não ocorreram diferenças estatísticas significativas entre os grupos. Ainda observando a Tabela 3, tanto o

tratamento com própolis quanto o com dexametasona proporcionaram maior contração das feridas em ambos os grupos e períodos, quando comparado ao tratamento com solução salina ($p=0,03$). E apesar da média da porcentagem de contração das lesões tratadas com própolis apresentarem-se maior do que as tratadas com dexametasona, nenhuma diferença significativa foi encontrada, semelhante aos resultados de Abreu et al., (2012).

O fechamento epitelial das feridas em ratos diabéticos foi claramente acelerado pelo tratamento com própolis, devido a sua redução da inflamação persistente em feridas diabéticas, como sugerido por LENNAN (2008).

Cerca de 3 dias após o ferimento, macrófagos chegam ao local da ferida e participam do processo de cicatrização pela fagocitose de agentes patogênicos e de detritos celulares, bem como pela secreção de fatores de crescimento, quimiocinas e citocinas (KOH, DIPIETRO, 2012, REINKE, SORG, 2012). Portanto, de grande importância à presença destas células nas avaliações microscópicas como notado em nosso trabalho.

Dessa forma, conforme a Tabela 4, a média do infiltrado de macrófagos no período de 10 dias no Grupo 1 foi maior em relação ao Grupo 2 ($p=0,03$), considerando que a porcentagem de contração da ferida no Grupo 2 foi maior, podemos sugerir um possível atraso do infiltrado de macrófagos, evidenciado pelo fato de que no período de 10 dias um infiltrado maior de macrófagos é observado no Grupo 1 em comparação ao Grupo 2.

Como macrófagos respondem de forma eficiente aos sinais químicos do ambiente mudando seus fenótipos, o diabetes mellitus afeta a expressão dos marcadores de ativação de macrófagos em feridas da pele. E essas respostas de ativação de macrófagos são mediadas por citocinas instrutivas que são afetadas por um ambiente hiperglicêmico (MIAO et al., 2012), assim como observamos em nosso trabalho.

Podemos observar ainda na Tabela 4, que o Grupo 2 apresentou diferenças significativas em relação as formas de tratamento ($p=0,003$), pois, os animais tratados com própolis apresentaram maior infiltrado de macrófagos comparado aos tratados com dexametasona e solução salina. Condição apontada por Lopes-Rocha et al., (2012), sugerindo que a redução na inflamação aguda em animais tratados com própolis comparados aos tratados com dexametasona e solução controle foi devido à ação dos flavonóides do própolis em populações de macrófago, e que a redução no exsudado inflamatório agudo também estimula a atividade precoce de macrófagos e linfócitos TCD4.

Reinke, Sorg (2012) consideram que os neutrófilos são recrutados para o local da lesão e estão presentes por 2 a 5 dias, a menos que a ferida esteja infectada. A função dos neutrófilos é crucial nos primeiros dias após a lesão, porque a sua capacidade de fagocitose e a secreção de proteases mata as bactérias locais e contribuem para a degradação do tecido necrosado. Além disso, atuam como agentes quimioatrativos para outras células que estão envolvidas na inflamação, por isso, nos analisamos a presença destas células em nosso trabalho. Por sua vez, Berlanga-Acosta (2011), afirma que as feridas diabéticas ficam estacionadas na fase inflamatória pela intensa infiltração e permanência de neutrófilos devido à secreção local de citocinas pró-inflamatórias, caracterizando as feridas diabéticas como feridas crônicas.

Podemos observar na Tabela 5, que no Grupo 1 no período de 4 dias ocorreu uma diferença significativa no infiltrado de neutrófilos em relação ao tratamento com própolis e as outras duas formas de tratamento. Observamos que a média de infiltrado de neutrófilos nos animais tratados com própolis foi menor em relação à média dos tratados com dexametasona e solução salina ($p < 0,0036$), diminuindo o tempo de inflamação persistente nos animais diabéticos. Em acordo com os resultados encontrados por Lennan (2008), Abreu et al., (2012) e Lopes-Rocha, et al., (2012), onde o própolis pôde acelerar a cicatrização de feridas em pacientes com diabetes, diminuindo a inflamação pela redução da infiltração de neutrófilos, podendo seu mecanismo de ação ser através de vias anti-inflamatórias, principalmente inibindo a mieloperoxidase na derme.

Além da avaliação do infiltrado de neutrófilos e macrófagos, que são células importantes no processo de cicatrização de feridas, avaliamos também a formação do tecido de granulação e a reepitelização, importantes, como consideram Arul et al., (2007), para o fechamento da ferida em paciente diabético.

Como observado na Tabela 6, em relação à média de formação do tecido de granulação, no Grupo 1 no período de 10 dias, o tratamento com própolis proporcionou maior formação deste tecido, com média de 1,87 ($p = 0,01$), enquanto que ambos os animais tratados com dexametasona e solução salina obtiveram média de 1,58. Atribuindo-se este resultado também à diminuição do infiltrado de neutrófilos e ao aumento do infiltrado de macrófagos, promovendo a cura da ferida.

É provável que a atenuação do recrutamento de células por meio do própolis acelerou a fase proliferativa do processo de cura, a transformação rápida de colágeno do

tipo III no tipo I e a modulação no processo inflamatório. Enquanto que a administração subcutânea de dexametasona em feridas de ratos afetou a síntese e a degradação de colágeno tipo I em fibras mais espessas, com uma maior ação sobre o colágeno tipo III, o qual desempenha um papel importante no início do processo de cura. A degradação do tipo I e III das fibras de colágeno é realizada por metaloproteinases (MMP), e a redução do nível destas collagenases, em resposta ao tratamento com glicocorticoides deve ser uma das causas do atraso no processo de cura (ABREU, et al., 2012).

Como observado na Tabela 7, em relação a reepitelização dos animais tratados com própolis, no período de 10 dias, podemos constatar que os animais tratados com própolis no Grupo 1 apresentaram maior formação de reepitelização, com média de 1,72 ($p=0,03$), enquanto que no Grupo 2 a média de formação foi de 1,58.

Contudo, no período de 10 dias, ocorreram diferenças significativas em relação à reepitelização, comparando-se as formas de tratamento. Dessa forma, os animais tratados com própolis obtiveram média de formação de reepitelização de 1,72 (0,03), enquanto que os tratados com dexametasona obtiveram média de 1,58 e os tratados com solução salina obtiveram média de 1,65 (TABELA 7).

Abreu et al., (2012) afirmaram que o grau de fibroplasia foi semelhante entre os grupos tratados com própolis e álcool, mas significativamente menor no grupo tratado com dexametasona. Devido à ação anti-inflamatória potente do própolis nas fases iniciais do processo de cura e na ação da dexametasona para reduzir a ativação, proliferação e sobrevivência de células inflamatórias, com a consequente redução da fibroplasia e reepitelização.

Os resultados encontrados neste estudo estão de acordo com os de Lennan (2008), que também mostrou que o número de fibroblastos e células epiteliais aumenta com a utilização do própolis nas feridas de animais diabéticos, e essa alteração é precedida pela diminuição da fase inflamatória e do aumento do número de macrófagos para a cura. Considerando que o principal fator atribuído ao própolis em feridas diabéticas é seu efeito estimulador na reepitelização dessas lesões.

Rahal et al., (2003) também observaram que o própolis levou a uma reepitelização mais rápida em relação aos animais tratados com mel ou solução fisiológica e Soengil et al., (2000) também encontraram, em feridas induzidas em coelhos, melhor reepitelização com o uso do própolis em relação à vaselina ou sulfadiazina de prata.

8 – CONCLUSÃO

Ao analisar a evolução da contração das feridas em animais diabéticos e não diabéticos, podemos concluir que o tratamento com própolis proporcionou melhor contração das lesões cutâneas comparadas as tratamento com solução salina, em ambos os grupos e períodos, porém, nenhuma diferença estatística significativa foi obtida, comparada as tratadas com dexametasona.

Na utilização do própolis a 10% proveniente de abelhas da espécie *Apis mellifera*, no tratamento das feridas em animais diabéticos e não diabéticos, concluímos que:

- O própolis apresentou efeitos estimulantes, favorecendo a cicatrização das lesões cutâneas em ratos diabéticos;
- O própolis diminuiu o infiltrado inflamatório, reduzindo o número de neutrófilos nos períodos iniciais da lesão em ratos diabéticos;
- Induziu o aumento do infiltrado de macrófagos e com isso maior produção de fatores de crescimento atuantes na fase proliferativa de lesões cutâneas;
- Proporcionou maior formação do tecido de granulação em ambos os grupos;
- Melhorou a reepitelização, especificamente em ratos diabéticos.

REFERÊNCIAS

ALVES, D. F. S. et al. Efeitos da aplicação tópica do mel de *Melipona subnitida* em feridas infectadas de ratos . **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, Natal, v. 35, n. 3, p. 188-193, mai./jun. 2008.

ABREU, A. M. et al. Effect of Topical Application of Different Substances on Fibroplasia in Cutaneous Surgical Wounds. **International Scholarly Research Network: Dermatology**, Diamantina, v. 2012. Fev. 2012.

AHMED, N. Advanced glycation end products—role in pathology of diabetic complications. **Diabetes Research and Clinical Practice**, Manchester, v.67, n. 1, p. 3-21. Jan. 2005.

ARUL, V.; KARTHA, R.; JAYAKUMAR, R. A therapeutic approach for diabetic wound healing using biotinylated GHK incorporated collagen matrices. **Life Sciences**, Chennai, v. 80, n. 4, p. 275–284. Jan. 2007.

ARUL, V. et al. Biotinylated GHK peptide incorporated collagenous matrix: a novel biomaterial for dermal wound healing in rats. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, Chennai, v. 73 n. 2, p. 383–391. Mai. 2005.

ALVEZ, C. et al. Mecanismos patogênicos da doença periodontal associada ao diabetes melito. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo**, Salvador, v. 51, n. 7, p. 1050-1057. Out. 2007.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of Medical Care in Diabetes—2011. **DIABETES CARE**, v. 34, SUP. 1, JAN. 2011.

BARBOSA, M. H. et al. Ação terapêutica da própolis em lesões cutâneas. **Acta Paulista de Enfermagem**, São Paulo, v. 22, n. 3, p. 318-22. Maio./jun. 2009.

BARBOSA, J. H. P.; OLIVEIRA, S. L.; SEARA, L. T. O Papel dos Produtos Finais da Glicação Avançada (AGEs) no Desencadeamento das Complicações Vasculares do Diabetes. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo**, Maceió, v. 52, n. 6, p. 940-950. Ago. 2008.

BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 41, n. 1, p. 27-51. jan./mar. 2005.

BERLANGA-ACOSTA, J. Diabetic lower extremity wounds: the rationale for growth factors-based infiltration treatment. **Int Wound J**, Havana, v. 8, n. 6, p. 612–620. Dez. 2011.

BERMUDEZ, D. M. et al. Pathobiology Impaired Biomechanical Properties of Diabetic Skin Implications in Pathogenesis of Diabetic Wound Complications. **The American Journal of Pathology**, Mississippi, v. 178, n. 5, p. 2215- 2223. May. 2011.

BERRETA, A. A. et al. Propolis Standardized Extract (EPP-AF®), an Innovative Chemically and Biologically Reproducible Pharmaceutical Compound for Treating Wounds. **International Journal of Biological Sciences**, Ribeirão Preto, v. 8, n. 4, p. 512-521. Mar. 2012.

BREM, H.; TOMIC-CANIC, M. Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes. **The Journal of Clinical Investigation**. New York, v. 117, n. 5, p. 1219–1222. May. 2007.

BERNARDI, S. et al. Cell-Based Therapies for Diabetic Complications. **Experimental Diabetes Research**. Disponível em: <doi:10.1155/2012/872504>. Acesso em: 06 de jun. 2012.

BITAR, M. S.; AL-MULLA, F. ROS constitute a convergence nexus in the development of IGF1 resistance and impaired wound healing in a rat model of type 2 diabetes. **Disease Models e Mechanisms**, Kuwait, v. 5, n. 3, p. 375-388. Maio. 2012.

BRITO FILHO, S. B. et al. Análise da cicatrização na linha alba com uso de extrato aquoso de *Orbignya phalerata* (babaçu). Estudo controlado em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, Maranhão, v. 21, n. 3, p. 76-88. 2006.

BONA, S. F. et al. Prevalência do pé diabético nos pacientes atendidos na emergência de um hospital público terciário de Fortaleza. **Rev Bras Clin Med**, Fortaleza, v. 8, p. 1-5. Jan. 2010.

BUSNARDO, V. L.; BIONDO-SIMÕES, M. L. P. Os efeitos do laser hélio-neônio de baixa intensidade na cicatrização de lesões cutâneas induzidas em ratos. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, São Carlos, v. 14, n. 1, p. 45-51. jan/fev. 2010.

CARVALHO, E. N.; CARVALHO, N. A. S.; FERREIRA, L. M. Experimental model of induction of diabetes mellitus in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 18, Special Edition, p. 60-64. 2003.

CABRAL, L. M. et al. Experimental model of double wounds on the rats back, in order to study the skin cicatrization process on rat treated with cellulose coat. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 18, Special Edition, p. 65-68. 2003.

DENTE, K. M. Alternative treatments for wounds: leeches, maggots, and bees. **Medscape Today/Medscape General Surgery**. 8 de nov. 2007. Disponível em: <<http://www.medscape.com/viewarticle/563656>. > Acesso em: 16 Abr. 2009.

DUARTE, N.; GONÇALVES, A. Pé diabético. **Angiologia e Cirurgia Vasculare**, Lisboa, v. 7, n. 2, p. 65-79. Jun./ 2011.

FANG, R. C.; GALIANO, R. D. A review of becaplermin gel in the treatment of diabetic neuropathic foot ulcers. **Biologics: Targets and Therapy**. Chicago, v. 2, n. 1, p. 1–12. Mar. 2008.

GARROS, I. D. et al. Extrato de *Passiflora edulis* na cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos: estudo morfológico e histológico. **Acta Cirúrgica Brasileira**. Maranhão, v. 21 n. 3, p. 55-65. Jun. 2006.

GURTNER, G. C. et al. Wound repair and regeneration. **NATURE**, Califórnia, v. 453, n. 15, p. 314- 321. May. 2008.

GUO, S.; DIPIETRO, L. A. Factors Affecting Wound Healing. **J Dent Res**, Chicago, v. 89, n. 3, p. 219-229. Mar. 2010.

HINDS, J. W.; McNELLY, N. A. Capillaries in aging rat olfactory bulb: a quantitative light and electron microscopic analysis. **Neurobiol Aging**, v.3, n. 3, p. 197-207. 1982.

KHANNA, S. et al. Macrophage Dysfunction Impairs Resolution of Inflammation in the Wounds of Diabetic Mice. **PLoS ONE**, Ohio, v. 5,n. 3. Mar. 2010.

KUMAR, ABBAS, FAUSTO. **Patologia: Bases patológicas das Doenças**. 7ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

Kolluru GK, Bir SC, Kevil CG. Endothelial dysfunction and diabetes: effects on angiogenesis, vascular remodeling, and wound healing. **Int J Vasc Med**. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1155/2012/918267>.> Acesso em: 06 nov. 2012.

KOH, T. J.; DIPIETRO, L. A. Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, Chicago, v. 13. July. 2011.

KNIP, M. Descriptive epidemiology of type 1 diabetes—is it still in?. **Diabetologia**, Finland, v. 55, n. 5, p. 1227-30. May. 2012.

KRÓL, W. Propolis: Properties, Application, and Its Potential. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/807578>.> Acesso em: 7 out. 2013.

LERCO, M. M. et al. Caracterização de um modelo experimental de Diabetes mellitus, induzido pela aloxana em ratos. Estudo clínico e laboratorial. **Acta Cirúrgica Brasileira**, Botucatu, v. 18, n. 2, p. 132-142. Mar./Abr. 2003.

LENZEN, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced Diabetes. **Diabetologia**, Hannover, v. 51, n. 2, p. 216–226. Feb. 2008.

LENNAN, S. V. et al. The anti-inflammatory agent Propolis improves wound healing in a rodent model of experimental diabetes. **Wound Repair and Regeneration**. Sydney, v. 16, n. 5, p. 706–713. Sep./out. 2008.

LE, N. N. et al. Implant Healing in Experimental Animal Models of Diabetes. **Journal of Diabetes Science and Technology**, Durhan, v. 5, n. 3, p. 605-618. May. 2011.

LOPES-ROCHA, R. et al. Effect of topical propolis and dexamethasone on the healing of oral surgical wounds. **Wound Healing Southern Africa**, Diamantina, v. 5, n. 1, p. 25-30. 2012.

MARCHINI, F. B. et al. Efeito do óleo de rosa mosqueta na cicatrização de feridas abertas. **Revista Paulista de medicina**, v. 106, n. 6, p. 356. 1988.

MANARA, L. et al. Utilização da própolis em odontologia. **FOB**. São Francisco, v. 7, n. 3/4, p.15-20, jul./dez. 1999.

MIAO, M. et al. Diabetes-impaired wound healing and altered macrophage activation: A possible pathophysiologic correlation. **Wound Rep Reg**, Shanghai, v. 20, n. 2, p. 203-213. Mar./Apr. 2012.

MENEZES, H. Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. **Arq. Inst. Biol**, Rio Claro, v.72, n.3, p.405-411, jul./set. 2005.

MOURA, S. et al. Aqueous Extract of Brazilian Green Propolis: Primary Components, Evaluation of Inflammation and Wound Healing by Using Subcutaneous Implanted Sponges. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. Belo Horizonte, v. 2011, jul. 2011.

NATHER, A. et al. Effectiveness of Vacuum-assisted Closure (VAC) Therapy in the Healing of Chronic Diabetic Foot Ulcers. **Annals Academy of Medicine**, Singapore, v. 39, n. 5, p. 353-358. May. 2010.

NAJAFI, M. et al. Effect of the water extracts of propolis on stimulation and inhibition of different cells. **Cytotechnology**. v. 54, n. 51, p. 49-56. Abr. 2007.

NEIDRAUER, M. et al. Near Infrared Wound Monitor Helps Clinical Assessment of Diabetic Foot Ulcers. **J Diabetes Sci Technol**, Pennsylvania, v. 4, n. 4, p. 792-798. Jul. 2010.

OLIVEIRA, S. T. et al. Formulações de confrei (*symphytum officinale* L.) na cicatrização de feridas cutâneas de ratos. **Revista da FZVA**, Uruguaiana, v. 7/8, n. 1, p. 65-74. 2000/2001.

PEREIRA, F. E. L. Inflamações. In: BOGLIOLO, LUIGI. **Patologia geral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. 4a ed., cap. 7, p. 189- 225.

PENG, C. et al. Lack of FGF-7 Further Delays Cutaneous Wound Healing in Diabetic Mice. **Plastic and Reconstructive Surgery**, Boston, v. 128, n. 6, p. 673-684. Dec. 2011.

RAHMANIAN-SCHWARZ, A. et al. Improvement of Skin Quality Using a New Collagen Scaffold in Acute Burns and Reconstructive Surgery: An In Vivo Evaluation of Split Skin Graft Transplantation in a Rat Model. **Dermatol Surg**, Tuebingen, v. 38, n. 8, p. 1338-1345. Aug. 2012.

_____. Evaluation of Two Commonly Used Temporary Skin Dressings for the Treatment of Acute Partial-Thickness Wounds in Rats. **Dermatol Surg**, Tuebingen, v. 38, n. 6, p. 898–904. June. 2012

RAHAL S. C. et al. Utilização de própolis ou mel no tratamento de feridas limpas induzidas em ratos. **Archives of Veterinary Science**, Botucatu, v. 8, n. 1, p. 61- 67. 2003.

REINKE, J. M.; SORG, H. Wound Repair and Regeneration. **Eur Surg Res**, Hannover, v. 49, n. 1, p. 35–43. Aug. 2012.

RIBEIRO, et al. Muscle protein metabolism in neonatal alloxanadministered rats: effects of continuous and intermittent swimming training. **Diabetology & Metabolic Syndrome**. Rio Claro, v. 4, n. 5, p. 1-11, 2012.

SANCHEZ, N. R. Aspectos morfológicos e morfométricos da reparação tecidual de feridas cutâneas de ratos com e sem tratamento com solução de papaína a 2%. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 8, n. 1, p. 18-23. 1993.

SEHN, E. et al. Dynamics of reepithelialisation and penetration rate of a bee propolis formulation during cutaneous wounds healing. **Anal Chim Acta**, Maringá, v. 635, n. 1, p. 115-120. Mar. 2009.

SOENGIL et al. Effect of propolis on healing of full thickness skin wound in rabbits. **Korean Journal of Veterinary Clinical Medicine**, v. 17, n. 1, p. 62-30, 2000.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Diabetes na prática clínica. E-book. 2011. Disponível em: <<http://www.diabetes.org.br/publicacoes/revista-sbd>.> Acesso em: 06 jul. 2012.

TRASK, B. C.; ROTE, N. S.; HUETHER, S. E. Innate Immunity: Inflammation. In: MC CANCE, K. L.; HUETHER, S. E. **Pathophysiology: the Biologic Basis for Disease in Adults and Children**. Elsevier mosby, 2006. 5a ed. 2006. cap 6, p. 175- 209.

THOOPPUTRA, T. et al. Survey of diabetes risk assessment tools: concepts, structure and performance. **John Wiley & Sons**. Disponível em: <doi: 10.1002/dmrr.2296.> Acesso em: 07 out. 2012.

VIEIRA-SANTOS, I. et al. Prevalência de pé diabético e fatores associados nas unidades de saúde da família da cidade do Recife, Pernambuco, Brasil, em 2005. **Cad. Saúde Pública**, Pernambuco, v. 24, n. 12, p. 2861-2870. Dez. 2008.

VODOVOTZ, Y et al. Translational Systems Approaches to the Biology of Inflammation and Healing. **Immunopharmacol Immunotoxicol**. Pennsylvania, v. 32, n. 2, p. 181–195. Jun. 2010.