



Efeitos da própolis na proliferação de fibroblastos em lesões cutâneas de ratos

Daniella Ribeiro da Paixão^{1*}; Pâmella Aparecida Flausino¹; Nayara Giovanini Reis²; Ciderléia Castro de Lima¹; Maria Tereza Carneiro Paschoal Bernardes²; Leandro dos Santos¹; José Antonio Dias Garcia¹

¹ Núcleo de Pesquisa Farmacologia e Cirurgia Experimental, Universidade José do Rosário Vellano - UNIFENAS, Rod. MG 179, Km 0, CP 23, CEP 37130-000, Alfenas, MG, Brasil.

² Departamento de Farmácia, Universidade José do Rosário Vellano - UNIFENAS, Rod. MG 179, Km 0, CP 23, CEP 37130-000, Alfenas, MG, Brasil.

RESUMO

O presente estudo teve por objetivo verificar o efeito tópico da própolis na proliferação de fibroblastos e a disposição e volume de fibras colágenas presentes durante o processo de reparo tecidual. Foram utilizados ratos *wistar*, machos, divididos em dois grupos: Grupo Controle (CC) n=16 lesão tratada com creme não-iônico; Grupo Própolis (PP) n=16 lesão tratada com creme não-iônico + Própolis 10%. Nos 4º, 7º, 14º e 21º dias de tratamento foram sacrificados 4 animais de cada grupo em câmara de gás carbônico. O tecido lesionado foi coletado e fixado em formalina a 10% por 48 horas, incluído em álcool a 70%, fixado em parafina e depositado em lâminas para análise histológica. Os resultados demonstraram um aumento no número de fibroblastos e também maior e melhor disposição de fibras colágenas no grupo PP em relação ao grupo CC. Assim, as evidências obtidas no estudo mostraram que o efeito da própolis na aceleração do processo de reparo tecidual não é somente por sua ação antiinflamatória, conforme diversos estudos demonstram, mas também por sua ação direta sobre a proliferação de fibroblastos, acelerando a reversão de fibrócito para fibroblasto, e, conseqüentemente favorecendo a síntese e deposição de fibras colágenas, melhorando o reparo tecidual e reduzindo o tempo de cicatrização.

Palavras Chave: Reparo tecidual de feridas. Própolis. Fibroblasto. Pele.

INTRODUÇÃO

O reparo tecidual é um dos processos mais estudados atualmente. Pesquisas têm avaliado a importância de sua estimulação na reabilitação funcional e estética do paciente. O reparo tecidual pode ocorrer por primeira ou segunda intenção, com estágios inflamatório, fibroblástico e remodelador. Ao longo do tempo, o homem sempre empregou artifícios com o intuito de aprimorar o processo cicatricial através do uso de substâncias ou procedimentos (Abreu et al., 2011).

Diversos estudos mostraram o efeito tópico de medicamentos sobre a ferida, como antibióticos, associação de antibiótico e aminoácidos, drogas antibacterianas (Carvalho & Oliveira, 1990), soluções anestésicas e antiinflamatórias (Vasconcellos et al., 2001; Chaves et al., 2004), própolis a 10% (Magro-filho, 1988) e insulina (Lima et al., 2004), para abreviar o tempo de cura, evitando infecções e danos estéticos.

Como alternativa aos agentes terapêuticos tradicionais, uma ampla variedade de fitoterápicos tem sido utilizada no tratamento de feridas cutâneas em humanos e animais (Rahal et al., 2003).

Vale ressaltar que a própolis é formada por secreções salivares das abelhas misturadas ao material resinoso e balsâmico coletado dos ramos, flores, pólen, brotos e exsudato de árvores, e, apresenta propriedades biológicas antimicrobiana, antifúngica, antiprotozoária, antioxidante e antiviral (Pereira et al., 2002).

No contexto da cicatrização a propriedade cicatrizante da própolis, assim como várias outras propriedades biológicas, está relacionada com flavonóides e ácidos fenólicos (Aryouet-Grand et al., 1993). Ao que se refere aos flavonóides, são considerados os principais compostos responsáveis pelos efeitos benéficos da própolis. Definem-se por compostos fenólicos provenientes de plantas, que agem em diferentes processos fisiológicos, atuando na ação e absorção de vitaminas, nos processos de reparo tecidual como antioxidantes e exercendo função antimicrobiana e moduladora do sistema imunológico (Barbosa et al., 2009).

Autor correspondente: Daniella Ribeiro da Paixão, Núcleo de Pesquisa Farmacologia e Cirurgia Experimental, Universidade José do Rosário Vellano – UNIFENAS. 180, Vila Jarbas Gamboji, Campo Belo, MG – Cep 37270-000. E-mail: danni-ribeiro@hotmail.com

Estudo tem mostrado que o creme de própolis, comparado com um de sulfadiazina de prata, apresentou menos inflamação e tempo reduzido no processo de cicatrização (Gregory et al., 2002).

Castaldo e Capasso (2002) reforçaram em estudo que o uso humano da própolis como cicatrizante de ferimentos é, ainda hoje, o mais empregado em todo o mundo. Alguns estudos demonstraram haver aceleração no processo de cicatrização em animais (Magro Filho, 1988; Arvouet-Grand et al., 1993) e humanos (Magro Filho, 1988; Gregory et al., 2002) tratados topicamente com extrato de própolis, porém, sem que sua influência direta sobre células com grande atividade no processo de reparo tecidual, como os fibroblastos, fosse investigada (Funari, 2005).

O objetivo do presente estudo foi analisar a dinâmica do efeito tópico da própolis na proliferação de fibroblastos em reparo tecidual cutâneo por segunda intenção. Para isso analisamos a reversão de fibrócitos para fibroblastos e a deposição das fibras colágenas no tecido lesado.

MATERIAL E MÉTODOS

PROTOCOLO ANIMAL: Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*), *wistar*, brancos, machos, com três meses de idade, pesando 270 ± 30 g, obtidos do Biotério Central da Universidade de Alfenas (UNIFENAS). Os animais foram submetidos à anestesia com Rompum® e Cetamin®, 1:1, sendo administrado 0,1mL da diluição para cada 100g de peso do animal intraperitoneal (IP) e após depilação manual e antissepsia com Povidona na região dorso-cervical. Foi realizada uma incisão elíptica na pele de 02 cm de diâmetro, com auxílio de um bisturi. Os animais receberam ração comercial própria para roedores e água “*ad libitum*” e foram divididos aleatoriamente em dois grupos experimentais: Grupo Controle (CC, n=16): o curativo foi processado utilizando água e sabão (pH neutro) e 1g de creme não - iônico uma vez ao dia, não oclusivo; Grupo Própolis (PP, n=16): neste o curativo foi feito com 1g de creme não - iônico contendo própolis a 10%, depois de higienizada com água e sabão (pH neutro) uma vez ao dia, curativo não oclusivo. Os animais permaneceram em gaiolas individuais durante todo o experimento. Nos 4º, 7º, 14º e 21º dias de tratamento pós-coleta de tecido epitelial, os animais foram submetidos à eutanásia, sendo 4 ratos por grupo em câmara de gás carbônico. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP da Unifenas em 17/04/2009 n° 03A/2008.

Faz saber que a Tintura de Própolis utilizada no tratamento do grupo PP apresentava as seguintes características organolépticas:

- Líquido Límpido a Turvo Acastanhado Amarelado;
- Odor e sabor característico.

A substância utilizada apresentava solubilidade miscível em água e álcool com turvação, entretanto, com propileno é totalmente miscível, o pH=4,93 e densidade de 0,93g/mL, com teor alcoólico de 66°. A Tintura de Própolis foi homogeneizada em creme não-iônico em concentração

de 10%, processada pelo Departamento de Farmácia da Universidade José do Rosário Vellano (UNIFENAS-Alfenas, MG).

Análise Histológica

O material coletado foi fixado em formalina a 10% por 48h e incluído em parafina. Cortes histológicos de 5µm foram depositados em lâminas e processados histologicamente (Junqueira & Carneiro, 2004). As lâminas foram coradas com Hematoxilina-Eosina (HE) para análise morfológica geral e para contagem de fibroblastos. Outras lâminas foram coradas com Picosírius Red para análise da densidade das fibras colágenas. Os cortes histológicos das lâminas coradas com HE foram analisados com microscópio óptico com luz normal, enquanto os corados com Picosírius red foram analisados com luz polarizada.

As imagens histológicas foram capturadas pela câmera digital Sony 12 Pixels, sob o uso de microscopia óptica com aumento de 400x. Foram analisados 08 campos de cada corte histológico por animal e a média do número de fibroblastos foi calculada. Para análise das fibras colágenas foram analisados 04 campos de cada corte histológico por animal, por meio da estereologia, de acordo com o princípio de Delesse (Mandarim de Lacerda, 1999). Usou-se a seguinte fórmula: $VV = PP (\%)$, onde:

VV = densidade de volume ou volume relativo;

PP = densidade de pontos (interseção de linhas) sobre as fibras colágenas;

PT = número total de pontos do sistema.

Por meio de um retículo quadrilátero de 100 pontos, calculou-se o volume das fibras colágenas observados nos cortes transversais da pele. Esta análise foi feita a partir das imagens obtidas em microscopia óptica com luz polarizada e com objetiva padronizada em aumento de 400x. Todas as análises e contagem de fibroblastos foram feitas por um único observador com duplo cego.

Análise Estatística

Os dados foram expressos em Média ± Erro Padrão da Média (Média ± EPM). Na obtenção dos níveis de significância com $\alpha=0,05$ utilizou-se o Teste *t-student* para expressar os valores de fibroblastos.

RESULTADOS

Os resultados demonstraram um aumento no número de fibroblastos no grupo PP em relação ao grupo CC nos 4º e 7º dias. Porém, uma diminuição significativa ocorreu no 14º e 21º dia. No grupo CC, destacou-se pelo aumento no número de fibroblastos no 14º e 21º dia em relação ao 4º e 7º dia, contudo, não houve diferenças entre o 4º e 7º dia e entre o 14º e 21º dia (Gráfico 1). O grupo PP apresentou um pronunciado aumento no número de fibroblastos no 7º dia em relação aos demais dias (Tabela 1 e Figura 2). Porém, com a evolução do processo cicatricial, este número sofreu uma diminuição significativa, e no 21º dia, apresentou o menor número de fibroblastos em relação aos demais dias (Gráfico 1).

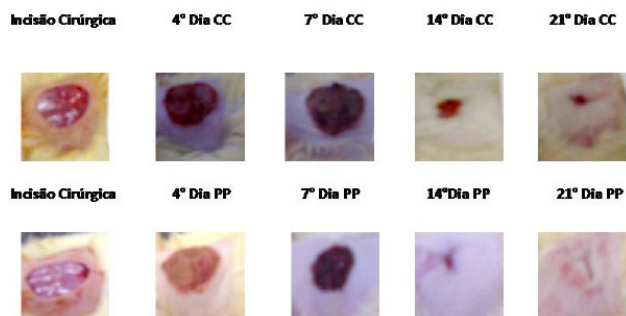


Figura 1. Representação de lesões tratadas por segunda intenção. Evolução clínica do reparo tecidual.

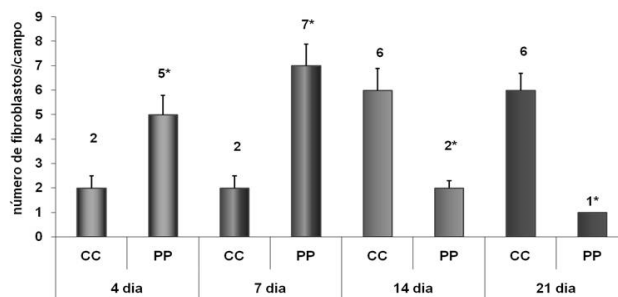


Gráfico 1. Número de fibroblastos/campo no 4º, 7º, 14º e 21º dia de experimento em lesões cutâneas em ratos *wistar* não tratados (CC) placebo, e tratados (PP) com Própolis. Valores expressos em média ± EPM.

*p<0,05 em relação ao CC

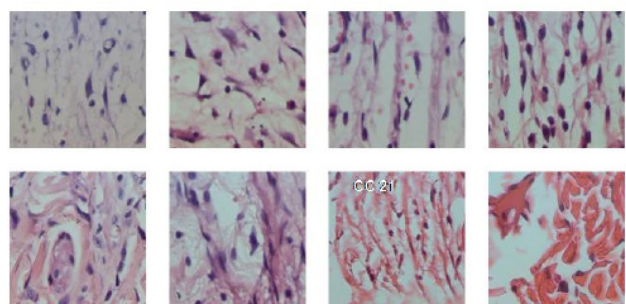


Figura 2. Fotomicrografia de fibroblastos na pele de ratos *wistar*. Fibroblastos observados e apresentados por setas no 4º, 7º, 14º e 21º pós-incisão na pele de ratos *wistar* do grupo de controle e tratados com Própolis respectivamente. Hematoxilina-Eosina 400x.

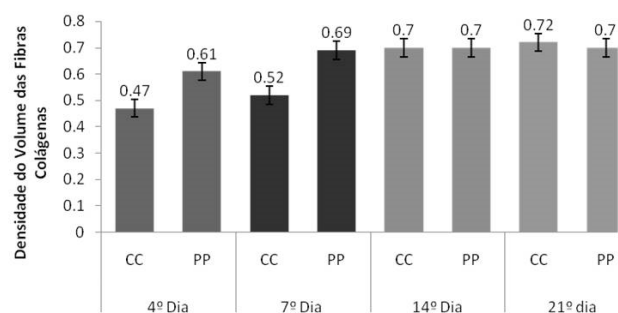


Gráfico 2. Número de colágeno/campo no 4º, 7º, 14º e 21º dia de experimento em lesões cutâneas em ratos *wistar*.

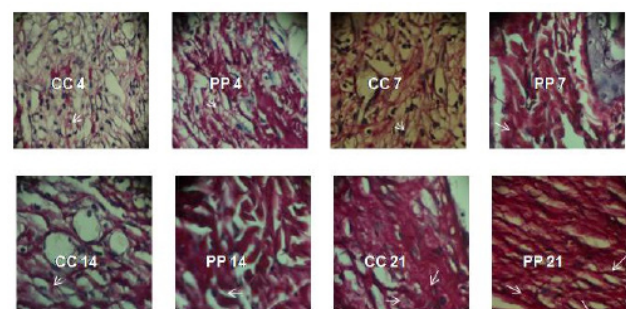


Figura 3. Fotomicrografia das fibras colágenas na pele de ratos *wistar*. Fibras colágenas observadas e apresentadas por setas no 4º, 7º, 14º e 21º pós-incisão na pele de ratos *wistar* do grupo controle e tratados com Própolis respectivamente. Pricosírius Red 400x.

Tabela 1. Valores de fibroblastos expressos como média ± EPM.

Dia	Fibroblastos CC	Fibroblastos PP	Colágeno CC	Colágeno PP
4º Dia	2,3±0,5	4,95±0,85	0,47	0,61
7º Dia	2,4±0,5	7,07±0,9*	0,52	0,69**
14º Dia	5,8±0,9	1,91±0,28	0,70	0,70
21º Dia	5,8±0,75	1±0	0,72	0,70

*p<0,05 em relação a todos os dias de tratamento em relação aos fibroblastos.

Valores de volume da densidade das fibras colágenas expressas através da estereologia (Princípio de Dessele).

**Apresentou maior evolução das fibras colágenas em relação ao 4º e 7º dia do CC.

Em relação à deposição das fibras colágenas observou-se um aumento nos 4º e 7º dia no grupo PP em relação ao CC, e tal aumento foi mais severo no 14º dia, permanecendo assim até 21º dia (Gráfico 2). O grupo CC apresentou um pequeno aumento na deposição das fibras colágenas do 4º para o 7º dia, evoluindo apenas no 14º dia de tratamento (Gráfico 2). Um marcado aumento na deposição das fibras colágenas foi somente presenciado no 14º dia do grupo CC, enquanto o grupo PP já apresentava fibras colágenas mais espessas em grande quantidade, mais organizadas e paralelas (Figura 3) umas as outras no 7º dia de tratamento (Gráfico 2, Tabela 1).

DISCUSSÃO

A própolis mostrou ser eficaz em acelerar a reversão de fibrócitos em fibroblastos, conforme mostram os resultados dos 4º e 7º dias do grupo PP em relação ao CC. Esses resultados corroboram estudos que demonstram estímulos adequados durante o reparo tecidual, que os fibrócitos reverterem para o estado de fibroblasto, reativando sua capacidade de síntese (Junqueira & Carneiro, 2004).

Estudos também comprovam que a própolis, em contato com a pele danificada, poderia nutri-la com vitaminas, aminoácidos e oligoelementos, estimulando os fibroblastos a produzirem elemento fibroso, como colágeno e elastina, que atuariam na regeneração da pele (Funari, 2005).

O fibroblasto é uma célula que apresenta prolongamentos citoplasmáticos irregulares, seu núcleo é ovóide, claro e grande, com cromatina fina e núcleo evidente. O fibrócito é uma célula menor, fusiforme e com menor número de prolongamentos citoplasmáticos (Junqueira & Carneiro, 2004).

Após exercerem seus papéis no reparo tecidual, os fibroblastos voltam para sua forma quiescente (fibrócito), e parte dos fibroblastos adquire alguns aspectos morfológicos e bioquímicos de células musculares lisas, onde essas modificações darão origem aos miofibroblastos. Organelas que participam da síntese da matriz extracelular e da produção de força mecânica, com influência na reorganização da matriz e na contração da ferida (Tomasek et al., 2002), explicam a diminuição destas células nos 14º e 21º dias no grupo PP.

Como o reparo tecidual no grupo CC não recebeu estímulo da própolis, o marcado aumento de fibroblastos nos 14º e 21º dias é explicado por um reparo tecidual mais retardado em relação ao grupo PP.

Quanto ao colágeno, foi observada uma deposição das fibras acentuada nos 4º e 7º dias do grupo PP em relação ao CC. Este resultado se justifica pela maturação do colágeno estar diretamente relacionada à oxigenação dos tecidos, dependendo da neovascularização e da fase fibroblástica, fatores estes induzidos pelo epitélio. Por este motivo, relatou-se que os animais que receberam tratamento com Própolis tiveram uma maior representação de fibras colágenas em relação ao grupo que não recebeu o estímulo da Própolis (Grupo CC).

No 7º, dia de tratamento com própolis, observou-se um elevado aumento na deposição das fibras colágenas (Tabela 1), mantendo-se estável nos 14º e 21º dias de tratamento em relação ao grupo CC, ou seja, pela ausência de estímulos, o grupo CC teve um retardado desenvolvimento na fase fibroblástica, sendo evidenciado pela marcante presença de fibras colágenas estarem presentes somente no 14º dia de tratamento, enquanto o grupo PP apresentou presença notória das fibras colágenas no 7º dia de tratamento (Gráfico 2).

Assim, as evidências obtidas em nosso estudo mostraram que o efeito da própolis na aceleração do reparo tecidual não é somente por sua ação antiinflamatória, conforme diversos estudos demonstram, mas também por sua ação direta sobre a proliferação de fibroblastos, acelerando a reversão de fibrócito para fibroblasto, e, conseqüentemente, favorecendo a deposição das fibras colágenas, melhorando o reparo tecidual e encurtando o tempo de cicatrização.

AGRADECIMENTOS

A Universidade José do Rosário Vellano e Fapemig, por auxílios à pesquisa e bolsa concedida.

ABSTRACT

Effect of propolis on fibroblast proliferation in skin lesions in rats

This study aimed to verify the effect of topical propolis on fibroblast proliferation and disposition and volume of collagen fibers present in the tissue repair process. We used male *Wistar* rats were divided into two groups: control (CC) n = 16 lesions treated with non-ionic cream; Propolis Group (PP) n = 16 lesion treated with non-ionic cream + 10% propolis. At 4, 7, 14 and 21 days of treatment were sacrificed four animals from each group in a carbon dioxide chamber. The injured tissue was collected and fixed in 10% formalin for 48 hours, then in 70% alcohol, embedded in paraffin and placed on slides for histological analysis. The results showed an increase in the number of fibroblasts and also bigger and better arrangement of collagen fibers in PP group than in CC group. Thus, the evidence obtained in the study showed that the effect of propolis to speed up tissue repair process is not only for its anti-inflammatory action, as several studies show, but also by its direct action on the proliferation of fibroblasts, accelerating the rate at which fibrocytes revert to fibroblasts, and collagen fiber arrangement, improving tissue repair and reducing the healing time.

Keywords: Wound healing. Propolis. Fibroblast. Skin.

REFERÊNCIAS

- Abreu JAC, Sousa AL, Alves CLGF, Nunes JT. Análise histológica da cicatrização de feridas cutâneas experimentais sobre ação do laser de baixa potencia. *Scient Med (Porto Alegre)*. 2011;21(3):96-100.
- Arvouet-Grand A, et al. Extrait de propolis: II. Etude de La cicatrization de plaies chez Le lapin ET chez Le rat. *J Pharm Belg*. 1993;48(3):171-8.
- Barbosa MH, et al. Ação terapêutica da própolis em lesões cutâneas. *Acta Paul Enferm*. 2009;22(3):318-22.
- Carvalho PSP, Oliveira GM. Cicatrização cutânea após aplicação tópica de nebacetin e gingilone em feridas infectadas. Estudo clínico e histológico em ratos. *Rev Odontol UNESP*. 1990;19:75-84.
- Castaldo S, Capasso F. Propolis an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*. 2002;73(S,1):S1-S6.
- Chaves DN, et al. Effects of thalidomide, cyclosporine and diclofenac on skin allograft survival in rabbits. *Transplant Proc*. 2004;36:1018-20.
- Funari CSD. Análise de Própolis da Serra do Japi, determinação de sua origem botânica e avaliação de sua contribuição em processos de cicatrização. [Dissertação]. Ribeirão Preto: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo; 2005.
- Gregory SR, et al. Comparasion of Propolis skin cream to silver sulfadiazine: a naturopathic alternative to antibiotics in treatment of minor. *J Altern Complement Med*. 2002;8(1):77-83.
- Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia básica: texto e atlas*. 10ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.
- Lima MHM, Mahmoud JGE, Gasparetti AL, Parisi M C, Velloso LA, Saad MJA. Efeito da insulina na cicatrização de feridas em ratos diabéticos e não diabéticos. In: 14º Congresso Brasileiro de Diabetes, 2003, Goiânia, 2003. v.1. p. 564.
- Magro-Filho O. Reparação de alvéolo dental e de ferida cutânea após irrigação com solução de própolis. Estudo histológico em ratos. [Dissertação] Araçatuba: Faculdade de Odontologia – UNESP; 1988.
- Mandarin de Lacerda CA. Whats is the interest of normal and pathological morphological research to be quantitative? The exemple of the stereology. *Braz J Morphol*. 1999;16(2):131-9.
- Pereira AS, Seixas FRMS, Aquino NFR. Própolis: 100 anos de pesquisas e suas perspectivas futuras. *Quim Nova*. 2002;25:321-6.
- Rahal SC et al. Utilização de própolis ou mel no tratamento de feridas limpas induzidas em ratos. *Arch Vet Sci*. 2003;8(1):61-7.
- Tomasek JJ, et al. Myofibroblast and mechano-regulation of connective tissue remodeling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002;3(5):349-63.
- Vasconcellos LS, et al. Efeito da hidrocortisona sobre a resistência cicatricial da pele em camundongos. *Rev Col Bras Cir*. 2001;28(6):438-43.

Recebido em 21 de fevereiro de 2013

Aceito em 5 de junho de 2013

