



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Instituto de Nutrição

Flavia Regina Sobreira Corrêa

**Polifenóis da própolis: uma estratégia nutricional sobre o reparo tecidual
cutâneo**

Rio de Janeiro

2016

Flávia Regina Sobreira Corrêa

Polifenóis da própolis: uma estratégia nutricional sobre o reparo tecidual cutâneo

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Alimentação, nutrição e saúde, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof.^oDr.^o. Julio Beltrame Delaprane

Coorientadora: Prof.^aDr.^a. Andréa Monte Alto Costa

Rio de Janeiro

2016

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CEH/A

C824 Corrêa, Flavia Regina Sobreira.
 Polifenóis da própolis: uma estratégia nutricional sobre o reparo tecidual
 cutâneo / Flavia Regina Sobreira Corrêa. – 2016.
 60 f.

 Orientador: Prof. Dr. Julio Beltrame Delaprane
 Coorientadora: Prof.^aDr^a. Andréa Monte Alto Costa
 Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto
 de Nutrição

 1. Nutrição – Teses. 2. Própole – Teses. 3. Inflamação – Teses. I.
 Delaprane, Julio Beltrame. II. Costa, Andréa Monte Alto. III. Universidade do
 Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Nutrição. IV. Título.

es CDU 612.3

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta
dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Flávia Regina Sobreira Corrêa

Polifenóis da própolis: uma estratégia nutricional sobre o reparo tecidual cutâneo

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Alimentação, nutrição e saúde, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 6 de maio de 2016.

Coorientadora: Prof^a. Dra. Andréa Monte Alto Costa

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Banca Examinadora:

Prof^o.Dr^o. Julio Beltrame Delaprane

Instituto de Nutrição - UERJ

Prof. Dr. Gilson Telles Boaventura

Faculdade de Nutrição- UFF

Prof.^a Dra. Bruna Romana de Souza

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Rio de Janeiro

2016

DEDICATÓRIA

A Deus, pois sem ele eu não teria chegado até aqui, aos meus pais por darem todo ensinamento e amor necessário, aos meus irmãos por serem meus eternos amigos e ao meu amor por estar sempre ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me guiar, me amar e provar tantas vezes que basta ter fé e confiar que ele proverá todas as coisas no momento exato.

Aos meus pais Sérgio Corrêa e Eliana Sobreira que sempre me deram conselhos, me, me guiaram e sempre estavam prontos para dar o suporte necessário. Amo vocês!

Aos meus irmãos Anderson Sobreira, Juliana Corrêa e Gabriela Corrêa que simplesmente são o motivo do meu ciúme, da minha proteção exagerada e do meu amor. Amo demais vocês três!

A minha “mãedrastra” Célia Almeida que simplesmente é minha segunda mãe sem sombra de dúvidas.

Ao meu amor Bruno Ferreira, meu amigo, meu confidente meu conselheiro, meu amor, meu grande amor.

As minhas avós Regina Helena e Neli Sobreira. Obrigada meus amores!

A minha melhor amiga Gabriela Lopes, que é praticamente uma irmã e que nunca deixou nossa amizade esfriar mesmo com a minha ausência.

A minha amiga Fernanda Seabra Schanuel que me ensinou quase tudo que hoje sei laboratório, por ter tido paciência e por ter se tornado uma grande amiga.

Ao meu orientador Julio Beltrame que me deu a oportunidade de realizar este sonho e que confiou no meu trabalho. Muito obrigada por tudo.

A minha coorientadora Andréa Monte-Alto Costa por ter me recebido tão bem, pelos ensinamentos, colaboração e paciência.

A professora . Bruna Romana de Souza pelos ensinamentos e pela colaboração.

Ao LRT (Laboratório de Reparo Tecidual) por ter me recebido tão bem e por ter fornecido amizades que levarei para vida toda.

A Bianca Saguie e Marco Aurélio pelos ensinamentos, por terem tido paciência e por terem se tornado meus amigos.

A toda equipe do LEING! Renatinha, Aline, Elisa, Paulinha, Karla, Elaine, Victor e Patrícia. Muito, muito obrigada! Especialmente para Elaine e Renatinha que mesmo com seus experimentos e análises se disponibilizaram a ajudar com os meus.

A todos que de maneira direta e indireta auxiliaram nessa etapa da minha vida. Muito obrigada!

Ao meu cachorrinho Nero por sempre demonstrar amor incondicional.

Deus nos fez perfeitos e não escolhe os capacitados, capacita os escolhidos. Fazer ou não fazer algo, só depende de nossa vontade e perseverança.

Albert Einstein

RESUMO

CORRÊA, Flávia Regina Sobreira. *Polifenóis da própolis: uma estratégia nutricional sobre o reparo tecidual cutâneo*. 2016. 60 f. Dissertação (Mestrado em Alimentação, Nutrição e Saúde) –Instituto de Nutrição, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

A própolis é uma substância resinosa, rica em polifenóis e extensivamente usada na medicina alternativa. A mesma é produzida pelas abelhas da espécie *Apis mellífera*, com o objetivo de proteger suas colmeias contra a ação de outros insetos, diversos agentes infecciosos ou outros agressores externos. Entre as diversas espécies de própolis existentes destaca-se a própolis vermelha brasileira, na qual a origem botânica foi identificada como *Dalbergia ecastophyllum* popularmente conhecida como rabo-de-bugio, oriunda do Estado de Alagoas. A própolis vermelha é rica em compostos fenólicos, e diversos efeitos biológicos estão atribuídos à sua composição de compostos potencialmente benéficos à saúde. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos dos polifenóis da própolis vermelha (PPV) no processo de reparo cutâneo em modelo murino de reparo tecidual. Camundongos Swiss (18) machos foram submetidos a lesões excisionais totais utilizando punch de biópsia de 8 mm no dorso depilado. Os animais foram tratados por via oral com doses diárias do veículo (solução hidroalcoólica com 2% de etanol, grupo controle) ou 100 mg/kg de PPV (grupo P100) ou 200 mg/kg de PPV (grupo P200). Ao final do período experimental observou-se que o grupo tratado com 100 mg/kg/dia de polifenóis da própolis vermelha (PPV) apresentou melhora no reparo tecidual, melhora da contração da lesão, aceleração da fase inflamatória constatado através da menor densidade de volume de células inflamatórias ($p < 0,05$), menos neutrófilos por mm^2 ($p < 0,05$), menor expressão proteica do NF- κ B, que corrobora com os menores níveis de produção de citocinas plasmáticas (TGF- β , TNF- α e IL-6). O grupo P200 mostrou resultados semelhantes ao grupo controle. Com base nesses dados, o tratamento oral com polifenóis da própolis vermelha brasileira na dose de 100 mg/kg/dia pode representar uma nova abordagem para o tratamento de lesões cutâneas modulando a resposta inflamatória em modelo murino de reparo tecidual.

Palavras chaves: Própolis vermelha. Polifenóis. Reparo tecidual. Inflamação

ABSTRACT

CORRÊA, Flávia Regina Sobreira. *Polyphenols of propolis: a nutritional strategy on the skin tissue repair*. 2016. 60 f. Dissertação (Mestrado em Alimentação, Nutrição e Saúde) –Instituto de Nutrição, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

Propolis is a resinous substance rich in polyphenols and extensively used in alternative medicine. The same is produced by bees *Apis mellifera* species, in order to protect their hives against the action of other insects, many infectious agents or other external aggressors. Among the diverse species of propolis highlight the Brazilian red propolis in which the botanical origin was identified as *Dalbergia ecastophyllum* popularly known as monkey-tail, coming from the State of Alagoas. The propolis is rich in phenolic compounds, and various biological effects are attributed to the composition of potentially beneficial compounds to health. The objective of this study was to evaluate the effects of the polyphenols of red propolis (PPV) in the skin repair process in mice tissue repair. Swiss mice (18) mice were subjected to total excising lesions using 8 mm biopsy punch on the shaved back. The animals were treated orally with daily doses of vehicle (2% hydroalcoholic solution of ethanol control group) or 100 mg/kg of PPV (P100 group) or 200 mg/kg of PPV (P200 group). At the end of the experiment it was observed that the group treated with 100 mg / kg / polyphenol day of propolis (PPV) showed improvement in tissue repair, improves the contraction of the injury, acceleration of the inflammatory phase evidenced by lower volume density inflammatory cells ($p < 0.05$), except neutrophils per mm^2 ($p < 0.05$), lower the protein expression of NF- κ B, which agrees with the lowest levels of plasma producing cytokines (TGF- β , TNF- α and IL-6). The P200 group showed similar results to the control group. Based on these data, the oral treatment with polyphenols of Brazilian propolis at a dose of 100 mg/kg/day may represent a new approach to the treatment of cutaneous lesions modulating the inflammatory response in a murine model of tissue repair.

Keywords: Red propolis. Polyphenols. Tissue repair. Inflammation

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fases do processo de reparo tecidual cutâneo	13
Figura 2 - Própolis Vermelha	21
Figura 3 - <i>Dalbergia ecastophyllum</i>	22
Figura 4: Transdução de sinal realizado pela RelA/NF- κ B	26
Figura 5 - Desenho experimental	29
Figura 6 - Evolução ponderal dos grupos experimentais	34
Figura 7 - Avaliação da contração de lesão.....	35
Figura 8 - Avaliação do processo de re-epitelização.....	36
Figura 9 - Avaliação da densidade de volume de células inflamatórias.....	37
Figura 10 - Avaliação de neutrófilos no tecido de granulação.....	38
Figura 11 - Avaliação de macrófagos no tecido de granulação.....	39
Figura 12 - Avaliação de vasos sanguíneos no tecido de granulação.....	40
Figura 13 - Avaliação de miofibroblastos no tecido de granulação	41
Figura 14 - Avaliação da expressão proteica do NF- κ B/ NF- κ B total.	42
Figura 15 - Avaliação das citocinas.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
CAPE	Fenil éster do ácido caféico
CD36	Grupamento de diferenciação 36
CEUA	Comitê de Ética para o Uso de Animais
EGF	Fator de crescimento epidérmico
eNOS	Óxido nítrico sintetase endotelial
FGF	Fator de crescimento fibroblástico
IFN- γ	Interferon- γ
IL-1	Interleucina-1
IL-6	Interleucina-6
KGF	Fator de crescimento de queratinócitos
MCP-1	Proteína quimioatrativa de monócitos1
MMPs	Metaloproteinases de matriz
MMP-2	Metaloproteinase de matriz-2
MMP-9	Metaloproteinase de matriz-9
NLS	Sinal de localização nuclear
PBS	Tampão salina fosfato
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaqueta
PF-4	Fator plaquetário-4
PPV	Polifenóis de própolis vermelha
RHD	Rel homology domain
EPM	Erro padrão da média
TAD	Domínio de transativação
TGF- α	Fator de crescimento transformante- α
TGF- β_1	Fator de crescimento transformante- β_1
TGF- β	Fator de crescimento transformante- β
TIMPs	Inibidores teciduais de metaloproteinases
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
α -SMA	α -actina de músculo liso

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	12
1	REPARO TECIDUAL CUTÂNEO	13
2	PRODUTOS APÍCOLAS	18
3	PRÓPOLIS	19
4	PRÓPOLIS VERMELHA	21
5	FATOR DE TRANSCRIÇÃO NF-κB E PRÓPOLIS	25
6	OBJETIVOS	27
6.1	Geral	27
6.2	Específicos	27
7	MATERIAL E MÉTODO	28
7.1	Obtenção das amostras brutas e preparação do extrato contendo polifenóis da própolis vermelha	28
7.2	Animais experimentais	28
7.3	Delineamento experimental	29
7.4	Protocolo de lesão	30
7.5	Análise macroscópica	30
7.6	Coleta do tecido, coloração e análises microscópicas	30
7.7	Imunohistoquímica e quantificações	31
7.8	Western blot	32
7.9	Citocinas	33
7.9.1	<u>Análise Estatística</u>	33
8	RESULTADOS	34
8.1	Avaliação da massa corporal dos animais experimentais	34
8.2	Análises macroscópicas	34
8.2.1	<u>Contração da lesão</u>	34
8.2.2	<u>Re-epitelização</u>	36
8.3	Análises microscópicas	37
8.3.1	<u>Densidade de volume do infiltrado inflamatório</u>	37
8.3.2	<u>Quantificação de Neutrófilos</u>	38
8.3.3	<u>Quantificação de Macrófagos</u>	39
8.3.4	<u>Quantificação de vasos sanguíneos</u>	40

8.3.5	<u>Densidade de volume de miofibroblastos</u>	41
8.4	Análises biomoleculares	42
8.4.1	<u>Expressão do fator de transcrição NF-κB</u>	42
8.4.2	<u>Citocinas inflamatórias</u>	43
9	DISCUSSÃO	44
	CONCLUSÃO	49
	REFERÊNCIAS	50
	ANEXO A – Comitê de ética	60

INTRODUÇÃO

O reparo tecidual é um processo contínuo que inicia após uma lesão. O processo de reparo tecidual é complexo e caracterizado por uma série de interações e de reações entre células e mediadores. Este processo pode ser dividido em três fases distintas, que se sobrepõem: a fase inflamatória, proliferativa e de remodelamento (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006; LI; CHEN; KIRSNER, 2007).

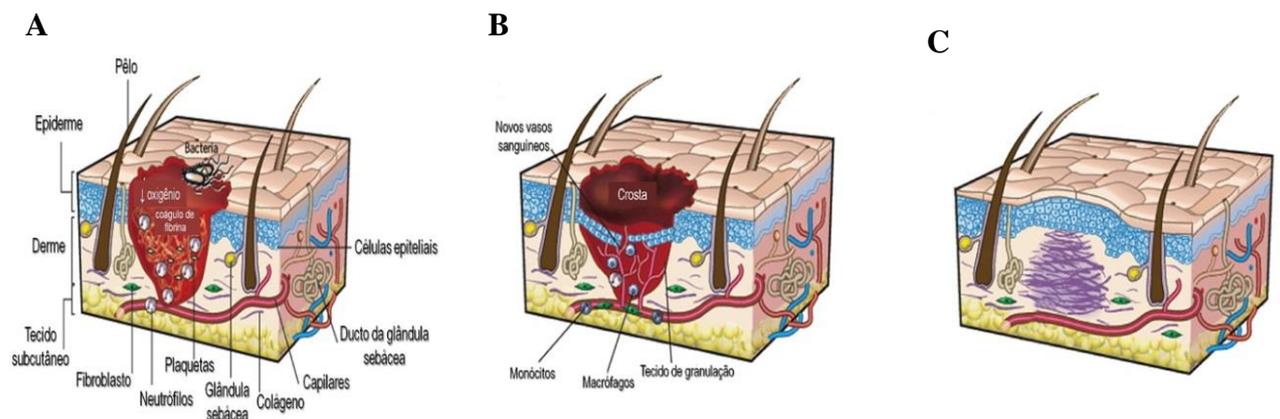
Nos últimos anos tem crescido o interesse em evidências com base na medicina alternativa, incluindo a utilização de produtos naturais no reparo tecidual (JACOB et al., 2015). A própolis é uma substância resinosa, rica em polifenóis, produzida pelas abelhas com o propósito de proteger as colmeias contra a ação de insetos e de outros agentes agressores. Recentemente, tem crescido o interesse em investigar as propriedades medicinais da própolis, a composição química da mesma e a atuação de seus compostos no organismo (BANKOVA, 2005). Os componentes da própolis incluem polifenóis (flavonóides, ácidos fenólicos, e ésteres), que tem sido atribuído a vários benefícios à saúde (RIGHI; NEGRI; SALATINO, 2013). Recentemente, um novo tipo de própolis, chamada própolis vermelha brasileira tem sido investigada devido suas atividades biológicas, tais como: antibacteriana (INUI et al., 2014), imunomoduladora (FREIRES; DE ALENCAR; ROSALEN, 2016), antifúngica (DAS NEVES et al., 2016), antitumoral (DE MENDONÇA et al., 2015), antioxidante (ALENCAR et al., 2007), hepatoprotetora (RODRÍGUEZ et al., 1997) e cicatrizante (DE ALMEIDA et al., 2013a; HOZZEIN et al., 2015). Uma vez que o reparo de lesões é um evento complexo e considerando que a própolis vermelha tem sido sugerida por desempenhar um papel no processo de inflamação devido a variedade de compostos fenólicos presentes em sua composição, no presente estudo foi avaliado o efeito dos polifenóis de própolis vermelha (PPV) em camundongos utilizando o modelo de reparo tecidual cutâneo.

1 REPARO TECIDUAL CUTÂNEO

A pele e seus anexos compõe o tegumento, que é o maior órgão do corpo. A pele é constituída por duas porções: epiderme e a derme. A epiderme é formada por um epitélio estratificado pavimentoso queratinizado e a derme é composta por tecido conjuntivo rico em fibras de colágeno (MARTIN, 1997). Entre as múltiplas funções que este órgão exerce, podemos destacar: defesa contra organismos estranhos, excreção de sais minerais, percepção sensorial, capacidade de renovação, proteção contra agentes nocivos externos, manutenção da temperatura corporal e síntese de vitamina D₃ (FREINKEL; WOODLEY, 2001; OVALLE et al., 2008). Por exercer diversas funções essenciais ao organismo, a manutenção e sua integridade é imprescindível. Sendo assim, o rompimento da integridade do tegumento (pele e seus anexos cutâneos) representa a formação de uma lesão havendo então a necessidade de reparo o quanto antes para que não ocorram infecções.

O processo de reparo tecidual é complexo e caracterizado por uma série de interações e reações entre células e mediadores. Este processo pode ser dividido em três fases distintas que se sobrepõe: fase inflamatória, fase proliferativa e fase de remodelamento (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006; LI; CHEN; KIRSNER, 2007) (Fig.1).

Figura 1 - Fases do processo de reparo tecidual cutâneo



Legenda: As três fases do reparo tecidual cutâneo. A) Fase Inflamatória. B) Fase proliferativa C) Fase de remodelamento.

Fonte: adaptada de GURTNER et al (2008).

A fase inflamatória (Fig. 1A) é uma etapa primordial do reparo, dando início ao processo que restabelece o tecido e suas funções (Fig. 1A). Esta fase é extremamente importante para processo de reparo e pode ser subdividida em 2 fases: a primeira fase está

relacionada à resposta vascular e tem como função a restauração da hemostasia, e a segunda fase consiste na resposta celular e a inflamação em si (LI; CHEN; KIRSNER, 2007). Com a hemorragia inicial há a exposição do tecido conjuntivo subendotelial altamente trombogênico para as plaquetas. Estas plaquetas interagem com colágeno, e assim ativam a cascata de coagulação (GANTWERKER; HOM, 2012). A formação de um coágulo no local da lesão composto por trombinas, plaquetas, fibrinas e fibronectina serve como matriz provisória para as células, entre elas: os neutrófilos, monócitos e células endoteliais. Esta matriz provisória além de auxiliar a migração de células para o local da lesão, atua também na concentração de quimiocinas e fatores de crescimento (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006)

Logo após a formação deste coágulo, inicia-se a segunda etapa da fase inflamatória que é a resposta celular. Nesta fase a degranulação de plaquetas estimula a liberação de fatores do crescimento e quimioatrativos. A liberação de interleucina-1 (IL-1), fator de necrose tumoral- α (TNF- α), fator de crescimento transformante- β (TGF- β), fator plaquetário- 4 (PF-4) e produtos do metabolismo bacteriano irão atrair os primeiros leucócitos para o local da lesão (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006). Os neutrófilos são encontrados em maior número no início da fase de reparo tecidual. Estas células secretam proteases e eliminam bactérias locais e após isto, são fagocitadas por macrófagos ou extrudados com a crosta (GANTWERKER; HOM, 2012; PROFYRIS; TZIOTZIOS; DO VALE, 2012). A menos que uma lesão esteja infectada, o influxo de neutrófilos cessará em poucos dias; o prolongamento da presença de neutrófilos no local da lesão pode atrasar o processo de reparo (MARTIN, 1997).

Devido à liberação de fatores quimioatrativos específicos como: TGF- β , fragmentos proteicos de matriz extracelular e proteína quimioatrativa de monócito 1 (MCP-1), os monócitos migram para o local da lesão e ao chegar ao local diferenciam-se em macrófagos (SINGER; CLARK, 1999).

Os macrófagos são células que atuam regulando a fase inflamatória do reparo, estas realizam a fagocitose de organismos patogênicos, atuam removendo os detritos teciduais e destruindo neutrófilos remanescentes. Estas células também liberam fatores de crescimento no local da lesão, entre eles podemos destacar: o TGF- β e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Estes fatores são importantes na migração e proliferação celulares e na produção da matriz extracelular (LI; CHEN; KIRSNER, 2007). Deste modo, os macrófagos possuem grande relevância devido a sua atuação na resolução da inflamação e desempenhando importante papel na transição entre inflamação e a fase proliferativa, exercendo assim significativa influência nos estágios finais do processo de reparo

(GURTNER et al., 2008; LI; CHEN; KIRSNER, 2007; SINGER; CLARK, 1999). Segundo MARTIN (1997) a redução do número de macrófagos durante a fase inflamatória pode atrasar o reparo de lesões teciduais agudas.

Subsequente à fase inflamatória, temos a fase proliferativa (Fig. 1B). Nesta fase a matriz provisória rica em fibrina é substituída por uma matriz rica em colágeno (PROFYRIS; TZIOTZIOS; DO VALE, 2012). Além disso ocorre a re-epitelização, angiogênese (formação de novos vasos sanguíneos a partir de outros pré-existentes), deposição de colágeno e diferenciação miofibroblástica (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006; DARBY et al., 2014).

Os macrófagos são as principais células que fornecem continuamente fatores de crescimento pertinentes ao processo de formação de uma matriz rica em fibras do sistema colágeno (fibroplasia) e angiogênese. Os fibroblastos realizam a produção da matriz extracelular que substitui a matriz provisória, na qual é necessária para dar suporte ao crescimento celular e aos novos vasos que transportam oxigênio e nutrientes para sustentar o metabolismo celular (SINGER; CLARK, 1999).

A re-epitelização é o processo de restauração da epiderme. Este evento inicia-se algumas horas após a lesão e envolve a migração e proliferação de queratinócitos formando a língua migratória, a diferenciação da neo-epiderme em um epitélio estratificado e a restauração da membrana basal que conecta a epiderme à derme subjacente (SINGER; CLARK, 1999). Fatores de crescimento produzidos pelas plaquetas e ativados pelos macrófagos, entre eles: fator de crescimento epidérmico (EGF) e fator de crescimento transformante- α (TGF- α) são liberados no local da lesão e induzem a re-epitelização. Outro fator que induz a re-epitelização é o fator de crescimento de queratinócitos (KGF) sintetizado pelos fibroblastos (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006). Os macrófagos estimulados pelo fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e pelo fator de crescimento transformante- β 1 (TGF- β 1), secretam EGF juntamente com as plaquetas, induzindo a migração e proliferação de fibroblastos do tecido adjacente à lesão (MAHDAVIAN DELAVARY et al., 2011; WITTE; BARBUL, 1997). O processo de re-epitelização tem início com o estímulo da migração e proliferação dos queratinócitos da margem da lesão em direção ao centro da mesma formando ao final uma nova epiderme, chamada de neo-epiderme (LI; CHEN; KIRSNER, 2007). No decorrer da migração dos queratinócitos a partir dos bordos da lesão há a digestão da matriz extracelular através de proteases, e os queratinócitos ao se tocarem têm a migração inibida por contato (GANTWERKER; HOM, 2012)..

A formação de novos vasos é necessária para fornecer um arcabouço nutricional para a formação do novo tecido de granulação (SINGER; CLARK, 1999). Através da ação do fator de crescimento fibroblástico (FGF) e do VEGF, células endoteliais proliferam formando novos vasos a partir de vasos sanguíneos pré-existentes (MARTIN, 1997). O estímulo à liberação do FGF no local da lesão é feito a partir de macrófagos e células endoteliais danificadas. Diversas células são responsáveis pela liberação do VEGF, entre elas: fibroblastos, queratinócitos, macrófagos e células endoteliais (GURTNER et al., 2008; LI; CHEN; KIRSNER, 2007).

Os fibroblastos que se encontram no tecido adjacente à lesão são ativados pela ação do PDGF e EGF, e ao serem ativados produzem a matriz extracelular, que é constituída de colágeno do tipo III, glicosaminoglicanos, fibronectina e outras proteínas de matriz (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006). A formação dessa matriz extracelular constituída por fibras de colágeno relativamente desorganizadas, alta densidade de macrófagos, fibroblastos, granulócitos, além do estabelecimento de uma nova rede de vasos, forma um novo tecido de reconstituição dérmica (REINKE; SORG, 2012). Através da ação do TGF- β_1 sintetizados pelos macrófagos, os fibroblastos em especial são estimulados a expressar α -actina de músculo liso (α -SMA) se diferenciando em miofibroblastos. Estas células depositam e sintetizam componentes da matriz extracelular e possuem propriedades contráteis, desempenhando um papel importante na contração dos bordos da lesão e deposição de matrix extracelular (DARBY et al., 2014; SINGER; CLARK, 1999).

O último estágio da fase de reparo tecidual (Fig. 1C) tem como característica a substituição do tecido de granulação rico em fibras de colágeno tipo III, vasos sanguíneos e células, por um contendo fibras de colágeno tipo I, contendo menos vasos sanguíneos e células (LI; CHEN; KIRSNER, 2007). A maioria das células sofre apoptose, entre elas: células endoteliais, miofibroblastos, macrófagos e miofibroblastos fazendo com que haja redução no número de células no tecido de granulação (DESMOULIÈRE et al., 1995; GURTNER et al., 2008). Durante a fase de remodelamento, o colágeno tipo III presente inicialmente na matriz extracelular é progressivamente degradado e substituído pelo colágeno tipo I, um colágeno mais espesso presente na pele normal. Esta deposição se aproxima da matriz extracelular da pele normal (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006). O processo de substituição do colágeno é mediado pela ação das metaloproteinases de matriz (MMPs) que são secretadas pelos fibroblastos, macrófagos e células endoteliais (GURTNER et al., 2008; SINGER; CLARK, 1999). Para haver um reparo normal, a atividade das MMPs é controlada pelos inibidores teciduais das metaloproteinases (TIMPs) (Li J et. al., 2007). Ao

final do processo de reparo temos a formação de uma cicatriz, porém esta não apresenta as mesmas propriedades da pele normal (DARBY et al., 2014; GURTNER et al., 2008).

2 PRODUTOS APÍCOLAS

Nos últimos anos tem crescido o interesse em evidências com base na medicina alternativa, incluindo a utilização de produtos naturais no reparo tecidual (JACOB et al., 2015). Entre a grande variedade de produtos naturais existentes no Brasil, os produtos apícolas têm apresentado destaque por fornecer diversas propriedades farmacológicas e por ser de fácil obtenção. A apicultura é uma atividade muito antiga, exercida desde a pré-história (DOS SANTOS; RIBEIRO, 2009; MAIA DE ARAUJO, 2009) e a mesma está diretamente relacionada com a preservação ambiental, pois a produção apícola de alta produtividade depende da conservação da mata nativa, evitando desmatamento e poluição ambiental. A apicultura colabora por meio da polinização das plantas pelas abelhas, com a reprodução de espécies nativas e cultivadas, evitando a extinção destas espécies e consequentemente contribuindo para o equilíbrio do ecossistema e manutenção da biodiversidade (TEIXEIRA; GODOY; COELHO, 2004). Por se tratar de uma atividade que envolve o aspecto social, econômico e ambiental, a apicultura é uma atividade do agronegócio que mais tem sido desenvolvida no Brasil, tornando-a conhecida como atividade de caráter exportador, em especial de própolis e mel orgânico (GONÇALVES, 2006; OLDONI, 2007). Com relação ao mercado, até cinco anos atrás a exploração de produtos apícolas no Brasil, era representado majoritariamente pelo mel, porém era inexpressivo quando comparado ao mercado mundial dado o preço praticado que não dava estímulos ao aumento da produção, na época quase que totalmente direcionada para o mercado interno. Em contrapartida, com a ocorrência de problemas envolvendo dois dos principais fornecedores mundiais em meados de 2000, Argentina e China, houve uma forte queda na oferta do produto no mercado internacional da ordem de 50.000 toneladas. Este fato elevou o preço do produto brasileiro a níveis nunca registrados, o que forneceu impulso necessário para o aumento da produção de mel no Brasil, tendo maior impacto na apicultura nordestina (NETO; NETO, 2005).

3 PRÓPOLIS

Entre os produtos apícolas, destaca-se a própolis. A mesma é produzida com o objetivo de proteger as colmeias contra a ação de outros insetos, diversos agentes infecciosos ou outros agressores externos (BURDOCK, 1998; GHISALBERTI, 1979). A própolis é uma resina produzida pelas abelhas da espécie *Apis mellífera* a partir de secreções de flores, árvores, folhas e pólen, recebendo ainda a adição de substâncias secretadas pela glândula salivar das abelhas. A *Apis mellífera* presente no Brasil, também chamada de abelha africanizada é consequência de um cruzamento entre subespécies europeias trazidas pelos jesuítas e abelhas africanas trazidas pelo pesquisador Warwick Kerr (MICHENER, 1975; TOLEDO et al., 2006). O objetivo inicial do pesquisador era contribuir para a melhoria da apicultura no Brasil através de um programa de melhoramento. Foi verificado que as abelhas africanas da espécie *Apis Mellifera Scutellata*, apresentavam como características positivas a alta capacidade de adaptação e produtividade, e em contrapartida apresentavam a alta agressividade e tendência enxameatória (enxameação é um fenômeno natural e espontâneo, no qual consiste na saída de parte das abelhas de uma colônia para formarem uma nova colônia em outro local, a fim de garantirem sua sobrevivência e a propagação da espécie). Sendo assim, o objetivo era eliminar ou reduzir, por seleção, as características negativas das abelhas africanas e posteriormente distribuir aos apicultores as rainhas selecionadas. Porém a ocorrência de enxameações fez com que a africanização dos apiários acontecesse antes da finalização do programa de seleção pretendido. Hoje temos então em todo território nacional uma abelha poli-híbrida africanizada (OLDONI, 2007). Essas abelhas dispersaram-se por toda América Central e América do Sul (MELLO; SILVA; NATAL, 2003). No Brasil, esta espécie encontra-se bem adaptada às áreas urbanas, margem de florestas e formações vegetativas abertas, como regiões costeiras (OLIVEIRA; CUNHA, 2005)

A própolis pode assumir tons que variam do amarelo-esverdeado, passando pelo marrom-avermelhado ao negro. A própolis é um material quebradiço quando frio e se torna dúctil e maleável quando aquecido, possui tamanha elasticidade que pode distender-se em até 200% antes de romper-se, apresentando 1/11 da rigidez da cera. Seu ponto de fusão é variável entre 60 à 70°C, sendo que pode atingir em alguns casos até 100°C. Das propriedades adesivas derivou a designação em língua inglesa de beeglue (cola-de abelha) (BANSKOTA; TEZUKA; KADOTA, 2001; BURDOCK, 1998). Seu aroma forte e característico é consequência de uma fração volátil de ácidos fenólicos (BANSKOTA; TEZUKA; KADOTA,

2001; BURDOCK, 1998; THOMSON, 1990). Estudos relataram que a composição química da própolis pode variar de acordo com a sazonalidade regional, podendo então influenciar o seu potencial de ação (SFORCIN, 2007). A variação sazonal pode alterar a composição da própolis fazendo com que haja a diminuição em alguns componentes biologicamente ativos acompanhado do aumento de outros (NUNES et al., 2009). A importância de estudos que abordam o efeito da sazonalidade dá-se devido a caracterização da matéria-prima de uma determinada região, uma vez que questões climáticas também se diferenciam em função da região onde o produto natural é obtido (SIMÕES-AMBROSIO et al., 2010). Outro fator que também pode alterar a composição da própolis é a flora utilizada pelas abelhas (BURDOCK, 1998; RUSSO; LONGO; VANELLA, 2002). Desse modo, a composição da própolis é um reflexo direto da flora onde as abelhas estão localizadas, assim como a sazonalidade regional (GHISALBERTI, 1979).

A própolis era utilizada pelos egípcios para embalsamar cadáveres devido sua ação anti-putrefativa. Suas propriedades medicinais também era reconhecidas por médicos gregos e romanos como Galeno, Dioscorides, Aristóteles e Plínio. Ao final do século XIX na África do Sul, a própolis foi utilizada na guerra dos Boeres devido sua atuação cicatrizante (CASTALDO; CAPASSO, 2002). Ao contrário do mel, não existem estatísticas confiáveis sobre a produção mundial da própolis. Entretanto, sabe-se que os maiores produtores mundiais são a China, o Brasil, a Austrália, o Uruguai e os Estados Unidos da América, os quais processam cerca de 200 toneladas de própolis mensalmente para o consumo mundial. O Japão é um dos maiores consumidores de própolis, este fato pode ser associado aos potenciais efeitos preventivos e terapêuticos associados à própolis (MANN, 1994; SEBRAE, 2006). Cerca de 75% de toda própolis produzida no Brasil é exportada, sendo o Japão o maior comprador (PEREIRA; SEIXAS; NETO, 2002). A Nova Zelândia tem apresentado significativo aumento no consumo anual de própolis (SEBRAE, 2006).

A própolis brasileira foi classificada em diferentes tipos de acordo com a vegetação extraída e região geográfica de origem (PARK et al., 2002). A própolis tem demonstrado várias atividades biológicas, como atividade antibacteriana (MARCUCCI et al., 2001), anti-inflamatória (KHAYYAL; EL-GHAZALY; EL-KHATIB, 1993; MONTPIED et al., 2003), cicatrizante (BARBOSA et al., 2009), antitripanossomal (DA SILVA CUNHA et al., 2004; MARCUCCI et al., 2001), antiviral (CHEN et al., 1996), anticarcinogênica (ASO et al., 2004), antioxidante (KUMAZAWA; HAMASAKA; NAKAYAMA, 2004; NAGAI et al., 2003) e anticariogênica (HAYACIBARA et al., 2005; KOO et al., 1999, 2000; PARK et al., 1998).

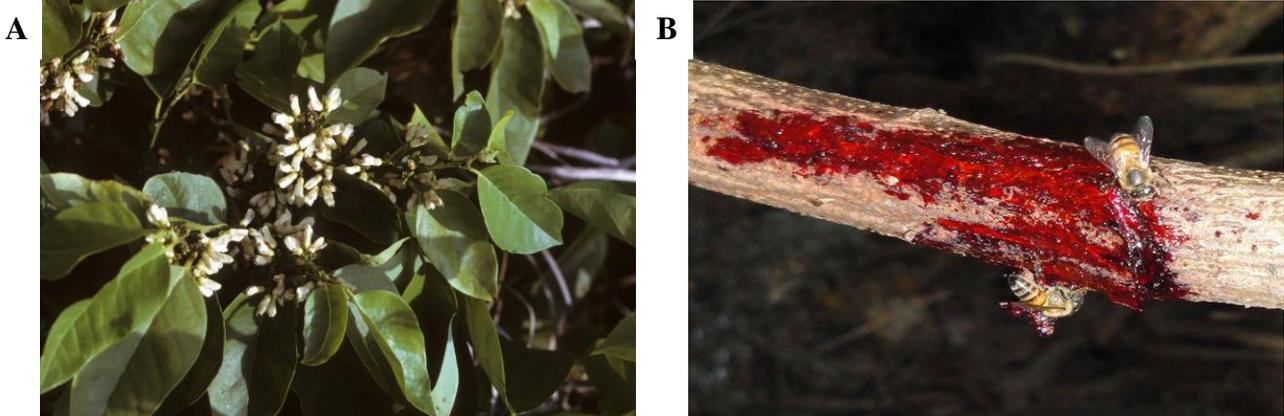
4 PRÓPOLIS VERMELHA

A própolis é um produto apícola que vem despertando interesse da comunidade científica. Já foram descritos diferentes tipos de própolis e a sua composição varia de acordo com a sazonalidade e flora visitada pela abelha (SFORCIN, 2007; SIMÕES-AMBROSIO et al., 2010). Entre as espécies de própolis existentes destaca-se a própolis vermelha. A própolis vermelha (Fig 2) Foi identificada pela primeira vez na Venezuela e em Cuba cujas origens botânicas foram identificadas como *Clusia scrobiculata* e *Clusia nemorosa* respectivamente (TRUSHEVA; TRUNKOVA; BANKOVA, 2007). Já a principal origem botânica da própolis vermelha encontrada no Brasil é oriunda do Estado de Alagoas e foi identificada como *Dalbergia ecastophyllum* (Fig. 3) popularmente conhecida como rabo-de-bugio, e pode ser encontrado ao longo da praia e região do mangue na região nordeste (SILVA et al., 2008)

Figura 2 - Própolis Vermelha



Fonte: (PERRI, 2011)

Figura 3 - *Dalbergia ecastophyllum*

Legenda: *Dalbergia ecastophyllum* (A), caule da *Dalbergia ecastophyllum* contendo própolis vermelha (B).

Fonte: <http://meliponariojandaira.blogspot.com.br/2011/02/abelhas-indigenas-sem-ferrao.html> (Acessado em: 17/03/2016).

A própolis vermelha brasileira tem sido investigada por suas várias atividades biológicas, entre elas: antibacteriana (INUI et al., 2014), imunomoduladora (FREIRES; DE ALENCAR; ROSALEN, 2016), antifúngica (DAS NEVES et al., 2016), antitumoral (DE MENDONÇA et al., 2015), antioxidante (ALENCAR et al., 2007), hepatoprotetora (RODRÍGUEZ et al., 1997) e cicatrizante (DE ALMEIDA et al., 2013a; HOZZEIN et al., 2015).

Além de resinas, ceras, óleos essenciais, pólen e vários outros compostos orgânicos, a própolis vermelha apresenta também em sua composição os polifenóis, que dá origem às suas diversas propriedades funcionais. Os polifenóis são considerados produtos do metabolismo secundário de plantas, e seu conteúdo está associado ao grau de maturação, clima, variedade, composição do solo, condições de armazenamento e a localização geográfica. Eles são produzidos como forma de defesa contra radiação UV e patógenos, além de serem responsáveis pela cor, aroma e adstringência em vários alimentos (MANACH et al., 2004; PELEG; BODINE; NOBLE, 1998; YORDI et al., 2012). Os compostos fenólicos possuem pelo menos um anel aromático e um grupo hidroxila, podendo se apresentar livre ou fazendo parte de heterosídeos, ésteres ou éteres (CUNHA, 2009; EVANS; EVANS; TREASE, 2009; SIMÕES, 2007). Com relação à ocorrência no reino vegetal, os compostos fenólicos são divididos em dois grupos: os amplamente distribuídos e os de distribuição restrita. Derivados de ácidos benzoicos e cinâmicos, flavonoides, cumarinas e derivados de polimerização (taninos e ligninas) pertencem ao primeiro grupo e as demais classes pertencem ao segundo grupo (SIMÕES, 2007).

Os polifenóis encontrados com mais frequência na própolis brasileira são: pinobanskina, pinocembrina, crisina, fenil éster do ácido caféico (CAPE), genisteína,

kaempferol, apigenina, e galangina (ADELMANN et al., 2007; BANKOVA, 2005; VOLPI; BERGONZINI, 2006). A ingestão de compostos fenólicos pode interferir em diversos processos fisiológicos, auxiliando na absorção e na ação de vitaminas, exercendo atividade antiviral, anti-inflamatória e antibacteriana, atuando no processo de reparo tecidual (BENGMARK; MESA; GIL, 2009; DOU, 2009), atuando como antiviral (MAURIN; BAILLY; COTELLE, 2003), imunomodulador (WILLIAMS ET al., 2004) e antioxidante (PAVILONIS et al., 2008; RODRIGUES et al., 2009). A propriedade anti-inflamatória da própolis foi atribuída à presença de compostos tais como: a quercetina, o ácido cafeico, naringenina e ao CAPE (SONG et al., 2002).

As propriedades biológicas dos compostos fenólicos estão relacionadas a atividade antioxidante que cada fenol exerce sobre determinado meio. Em contrapartida a atividade dos antioxidantes depende da estrutura química do composto fenólico, podendo ser determinada pela ação da molécula como agente redutor (velocidade de inativação do radical livre, reatividade com outros antioxidantes e potencial de quelação de metais).

Ao avaliar o efeito da própolis vermelha no tratamento de queimaduras da córnea em coelhos induzida por hidróxido de sódio, OZTÜRK et al (2000) constataram o efeito anti-inflamatório da própolis comparado à dexametasona. Neste estudo os animais foram divididos em três grupos: Grupo 1 (controle) no qual foi administrado 0,3% de tobramicina e uma solução tamponada com fosfato; grupo 2 no qual foi tratado com cobertura contendo antibiótico e extrato etanólico de própolis a 1%; o grupo 3 no qual recebeu cobertura contendo antibiótico e dexametasona a 1%. O grupo tratado com dexametasona foi mantido como controle positivo. Os fármacos foram administrados 4 vezes por dia durante 7 dias. O efeito anti-inflamatório da própolis vermelha foi constatado através da redução da inflamação da córnea na qual foi avaliada pelo cálculo da média do índice inflamatório, obtido a partir da observação clínica de sintomas como: hiperemia ciliar e edema da córnea central e periférico. Através do estudo foi visto que a própolis vermelha promoveu a redução da infiltração de células inflamatórias. Ainda sobre o tratamento com a própolis vermelha em queimaduras da córnea, um estudo utilizou 2 grupos divididos em: Grupo própolis, no qual foi tratado com emulsão contendo 1% de própolis e o grupo controle que recebeu a mesma formulação, porém sem a própolis. Foi constatado que a própolis exerceu efeito anti-inflamatório através da redução de neutrófilos no local da lesão e foi constatado também que a própolis proporcionou a regeneração epitelial (MARTIN et al., 2013)

A atividade anti-inflamatória de soluções hidroalcoólicas da própolis foi constatada tanto através de injeções intraperitoniais, assim como em aplicações tópicas, ou mesmo via

oral em modelo murino (MENEZES; ALVAREZ; ALMEIDA, 1999). Além disso HU et al (2005) associaram o efeito anti-inflamatório da própolis vermelha à redução dos níveis de óxido nítrico, prostaglandinas E2 e interleucina-6 (IL-6).

Um estudo utilizando modelo murino de aterosclerose (animais LDL^{-/-}) associou o potencial anti-inflamatório de frações ricas em polifenóis de diferentes própolis (marrom, verde e vermelha) à redução da expressão gênica de citocinas e quimiocinas como: MCP-1, IFN- γ e IL-6, receptor de trombospondina (CD36). Foi observado também que os polifenóis da própolis vermelha foi capaz de exercer maior efeito anti-inflamatório quando comparado aos polifenóis da própolis verde e marrom em placas ateroma (DALEPRANE et al., 2012)

Um extrato rico em polifenóis da própolis vermelha foi utilizado em modelo animal de isquemia-reperfusão renal (IR) (dano celular induzido após reperfusão de um órgão isquêmico) (DA COSTA et al., 2015). No estudo, ratos Wistar machos foram submetidos à nefrectomia unilateral e contralateral renal I/R (60min). Os animais foram divididos em quatro grupos: grupo *Sham*, grupo RP (ratos *sham* tratados com 150mg/kg/dia de própolis vermelha por técnica de gavagem), grupo IR (ratos submetidos a isquemia-reperfusão renal) e grupo IR-RP (ratos tratados com 150mg/kg/dia de própolis vermelha antes de serem submetidos à isquemia-reperfusão). O estudo concluiu que os polifenóis da própolis vermelha protegeram contra insuficiência renal aguda isquêmica e essa proteção foi associada à redução do estresse oxidativo, ao aumento da óxido nítrico sintetase endotelial (eNOS) e melhora na expressão da heme-oxigenase. O aumento da eNOS traz benefícios, pois a redução da mesma contribui para insuficiência renal por causar disfunção endotelial. Heme-oxigenase proporciona uma proteção contra lesão por isquemia-reperfusão nos rins devido as suas atividades antioxidante, anti-inflamatória e citoprotetoras. (DA COSTA et al., 2015).

Em um recente trabalho foi demonstrado que a associação do extrato hidroalcoólico da própolis vermelha em curativos a base de filme de colágeno, em lesões provenientes de queimaduras foi capaz de reduzir a severidade inflamatória, aumentar os níveis de miofibroblastos e induzir a substituição de colágeno do tipo III por colágeno do tipo I (DE ALMEIDA et al., 2013).

5 FATOR DE TRANSCRIÇÃO NF- κ B E PRÓPOLIS

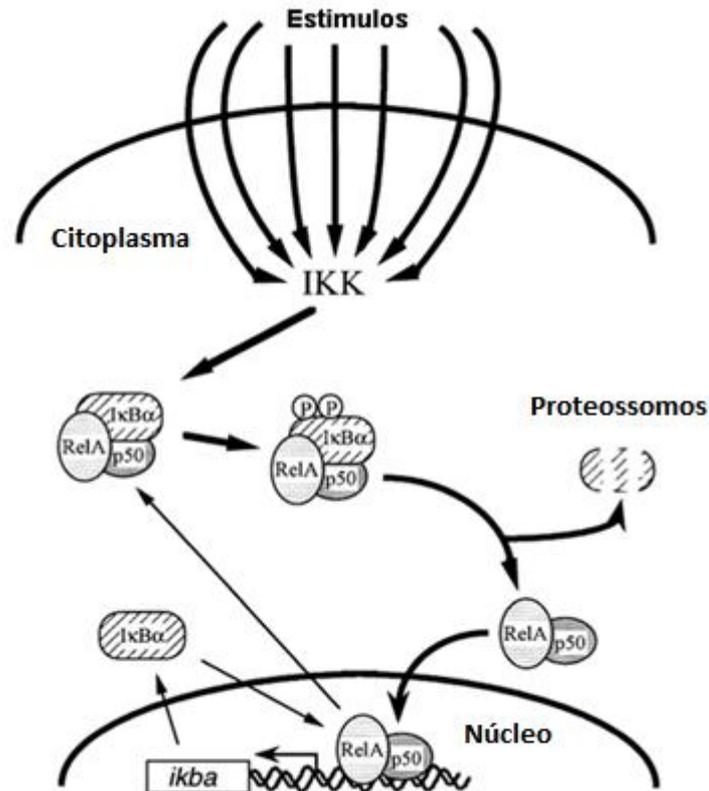
O fator de transcrição NF- κ B (fator nuclear κ B) exerce função na regulação de vários genes que controlam a resposta inflamatória em diversas doenças (BALDWIN, 1996). O NF- κ B pertence a uma família de fatores de transcrição que inclui 5 genes, são eles (DOLCET et al., 2005):

- NF- κ B1 (p50/p105)
- NF- κ B2 (p53/p100)
- RelA (p65)
- c-Rel
- RelB

Esta família é caracterizada por conter uma porção N terminal com cerca de 300 aminoácidos Rel homology domain (RHD), que se subdivide em uma região que se liga ao DNA e outra denominada de domínio de dimerização. Na região de domínio de dimerização encontra-se um sinal de localização nuclear (NLS). A região C-terminal se diferencia em cada subunidade, sendo que p65, c-Rel e RelB possui um domínio de transativação (TAD), necessário para dar início a atividade transcricional (FRANCO, 2010).

Quando não estimulado, o NF- κ B encontra-se no citoplasma ligado a proteína inibitória: o κ B (I- κ B), sendo então incapaz de regular a transcrição genética. Para que ocorra sua ativação é necessária a ação da proteína conhecida como IKK. Esta proteína, ao ser fosforilada (por exemplo: via Akt, IL-1, TNF) torna-se ativa, podendo então fosforilar o I- κ B, levando-o para a ubiquitinação e conseqüente degradação via proteossomos (SURH et al., 2001). Com a degradação do I- κ B, o NF- κ B torna-se livre no citoplasma e, desta forma será translocado para o núcleo onde irá atuar como fator de transcrição de diferentes genes alvos envolvidos no processo de inflamação (CHANG et al., 2003). Entre os estímulos para ativação deste fator de transcrição estão os neurotransmissores (tais como o glutamato), proteínas neurotóxicas (como a β -amilóide), neurotrofinas, citocinas (IL-1 e TNF), ésteres de forbol, glicocorticoides, peptídeo natriurético atrial, ceramidas, produtos provenientes de bactérias e vírus, irradiação ultravioletae produtos de reações de enzimas como a óxido nítrico sintase induzível (O'NEILL; KALTSCHMIDT, 1997).

Figura 4 - Transdução de sinal realizado pela RelA/NF- κ B



Legenda: Transdução de sinal realizado pela RelA/NF- κ B.
 Fonte: Adaptada de GILMORE (1999)

O TNF- α e IL-1 representam típicas citocinas pró-inflamatórias das quais são liberadas rapidamente em infecções ou injúrias teciduais. Devido o papel do NF- κ B na expressão de outros genes de citocinas pró-inflamatórias, moléculas de adesão, o mesmo tem sido extensivamente estudado (LAWRENCE, 2009). Foi constatado que a própolis reduziu os níveis de IL-1, TNF- α e IL-6 associado a inibição da expressão do fator de transcrição NF- κ B (WU et al., 2013). BÚFALO et al (2013) analisaram a atividade anti-inflamatória de diferentes concentrações de própolis, do seu constituinte CAPE e do óxido nítrico em macrófagos. Foi observado que tanto a própolis quanto o CAPE apenas foram capazes de reduzir a produção de óxido nítrico por macrófagos e reduzir a expressão do NF- κ B em modelo murino.

Deste modo, com base na literatura verificamos que a própolis vermelha pode influenciar benéficamente o processo de reparo tecidual cutâneo devido às suas diversas propriedades biológicas, entre elas a anti-inflamatória podendo então interferir em determinadas fases do reparo em especial a fase inflamatória.

6 OBJETIVOS

6.1 Geral

Avaliar o efeito dos polifenóis da própolis vermelha (PPV) sobre o reparo de lesões excisionais totais na pele de camundongos.

6.2 Específicos

- a) Avaliar o efeito da administração oral de 100 mg/kg/dia e 200 mg/kg/dia de polifenóis da própolis vermelha (PPV) sobre a contração e re-epitelização das lesões cutâneas;
- b) Avaliar e quantificar a densidade de células inflamatórias no tecido de granulação;
- c) Avaliar e quantificar vasos sanguíneos no tecido de granulação;
- d) Avaliar e quantificar as principais células inflamatórias do tecido de granulação;
- e) Avaliar e quantificar os níveis proteicos de TGF- β ativo, TNF- α e IL-6 no soro.
- f) Avaliar a expressão proteica do NF- κ Bp65 na lesão.

7 MATERIAL E MÉTODO

7.1 Obtenção das amostras brutas e preparação do extrato contendo polifenóis da própolis vermelha

As amostras de própolis bruta foram obtidas no mês de junho de 2014, em caráter de doação, provenientes de um produtor do município de Barra de Santo Antônio do Estado de Alagoas, cujas coordenadas são 09°11'19,67"S/ 35°27'47,03". A obtenção do extrato contendo polifenóis da própolis vermelha (PPV) foi realizada segundo DALEPRANE et al (2012) com pequenas modificações. O processo de extração de compostos fenólicos iniciou com a maceração da própolis vermelha. Posteriormente, o macerado foi pesado (48g) e transferido para um frasco âmbar contendo 480 mL de etanol P.A (80%). A extração foi realizada a 60°C, em banho maria termoestatizado, por 30 minutos, sob agitação constante. Em seguida, foi filtrado com auxílio de uma bomba a vácuo contendo um filtro de 22µm, o filtrado foi encaminhado para a centrifugação a 5000 g por 10 min. O sobrenadante foi transferido para um balão volumétrico, onde foi evaporado a baixa pressão no aparelho Rotaevaporador (Fisatom 801, Fisatom Equipamentos Científicos Ltda. São Paulo. Brasil) e em seguida foi liofilizado (HetoPowerDry LL3000, ThermoScientific) A amostra da PPV foi ressuspenida em solução hidroalcolica a 2% de etanol.

7.2 Animais experimentais

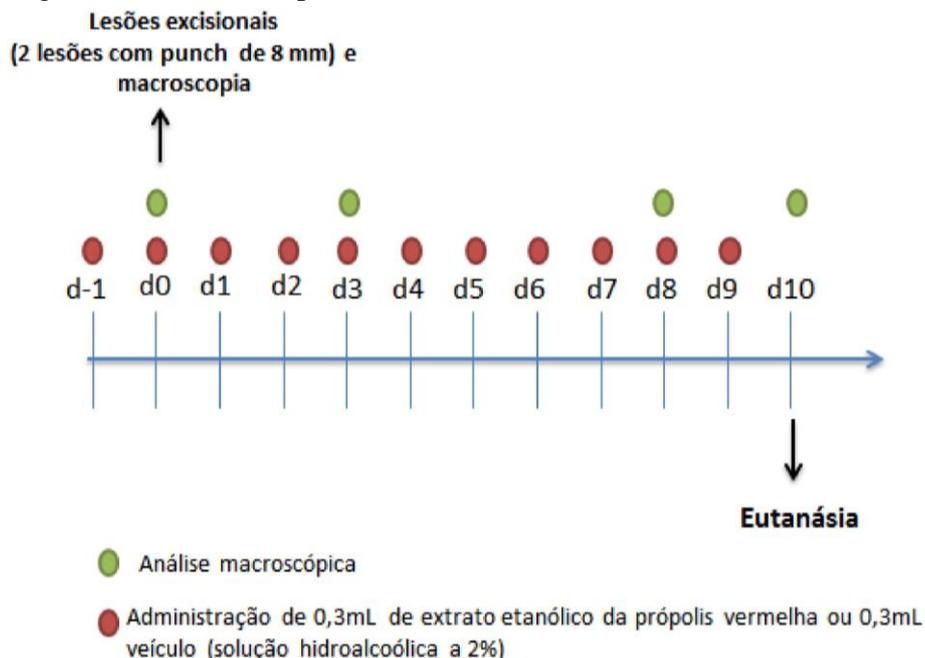
Foram utilizados 18 camundongos *Swiss* machos oriundos do biotério do Departamento de Histologia e Embriologia do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, com 2 meses de idade, pesando aproximadamente 22g ± 2. Durante todo período experimental, os animais foram acondicionados em uma sala com temperatura controlada (22°C) sob um ciclo de 12h de claro e 12h de escuro, recebendo água e ração comercial NUVILAB CR-1 *ad libitum* diariamente. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética de Uso de Animais da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (CEUA/028/2014) (Anexo A)

7.3 Delineamento experimental

Os animais foram divididos em 3 grupos (n=6 animais por grupo) sendo eles: grupo Controle recebendo solução veículo (solução hidroalcoólica com 2% de etanol), grupo P100 recebendo uma dose diária 100 mg/kg de PPV (reconstituído em solução veículo) e grupo P200, recebendo uma dose diária 200 mg/kg de PPV (reconstituído em solução veículo). As concentrações utilizadas em nosso estudo foram baseadas em estudos prévios (AL GHAMDI et al., 2015; DALEPRANE et al., 2012; RODRIGUES et al., 2009; TELES et al., 2015) que mostraram doses seguras e com atividade biológica dos polifenóis da própolis. A massa corporal foi medida desde o início até o final do experimento

O tratamento com PPV ou veículo iniciou-se um dia antes da realização da lesão (d-1) com volume de 0,3 mL por técnica de gavagem. Um dia após a administração dos PPV (d0), foram realizadas duas lesões excisionais totais no dorso depilado dos animais. A administração de PPV ou veículo manteve-se diariamente até 9 dias após a lesão (d9) e os animais foram mortos 10 dias após a realização da lesão (d10).

Figura 5 - Desenho experimental



Fonte: A autora, 2016.

7.4 Protocolo de lesão

Para realizar a lesão, todos os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de cetamina (150 mg/kg) e xilazina (15mg/kg). Após a tricotomia do dorso, duas lesões excisionais com 8mm de diâmetro foram realizadas com o auxílio de um *punch* de biópsia, removendo a epiderme e a derme e expondo o panículo carnoso de cada animal. As lesões não foram suturadas e cicatrizaram por segunda intenção.

7.5 Análise macroscópica

A área da lesão foi medida no dia da lesão (d0) e 3 (d3), 8 (d8) e 10 (d10) dias após a lesão. Para isto, uma folha de papel celofane transparente foi aplicada sobre as lesões e suas margens foram desenhadas com auxílio de uma caneta permanente (NASCIMENTO; COSTA, 2006). As áreas foram digitalizadas e analisadas utilizando o software de imagens Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, versão 1.43). Os dados de contração foram expressos como porcentagem da área inicial lesada. Animais com sinais de re-epitelização foram contabilizados.

7.6 Coleta do tecido, coloração e análises microscópicas

Ao final do período experimental, os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de cetamina (150 mg/kg) e xilazina (15mg/kg), e após a retirada dos tecidos, foram mortos por exposição ao CO₂ e a coleta do sangue foi realizada por punção cardíaca. A lesão localizada ao lado direito (sem pele sã adjacente) foi congelada a -80°C e direcionada para análise molecular (western blot). A lesão localizada ao lado esquerdo (com pele sã adjacente) foi fixada em formaldeído tamponado (pH =7,2), incluída em parafina (cortes de 5 µm) e direcionada para análise histológica e imunohistoquímica.

A avaliação da densidade do infiltrado inflamatório e quantificação dos vasos sanguíneos foi realizada na área lesada, utilizando as lesões coradas com hematoxilina e

eosina que foram digitalizadas utilizando o escaner de lâminas Panoramic MIDI digital (3DHISTECH Ltd. Budapeste, Hungria).

Para análise da densidade de células inflamatórias, foi utilizado um método estereológico de contagem de pontos descrito previamente por GUNDERSEN et al. (1988). Foram identificadas como células inflamatórias as basófilas com formato arredondado. Esse método consiste em verificar a densidade de volume (V/v). A densidade de volume de cada estrutura é expressa como a porcentagem de pontos que tocam em cada estrutura (Pp) em relação ao número de pontos totais (sistema teste com 16 pontos). Tanto na avaliação do infiltrado inflamatório quanto na contagem de vasos sanguíneos, foram analisados 5 campos aleatórios por animal ($14.400\mu\text{m}^2$). Os dados foram expressos em densidade de volume de infiltrado inflamatório (Vv [células inflamatórias] %) e vasos por mm^2 .

7.7 Imunohistoquímica e quantificações

Para a quantificação de neutrófilos e macrófagos, os cortes foram imunomarcados respectivamente com anticorpo monoclonal anti-mieloperoxidase produzido em rato (1:500; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) e anticorpo monoclonal anti-F4/80 produzido em rato (1:500; Serotec Inc., Raleigh, Reino Unido). Para recuperação antigênica os cortes foram incubados em tampão citrato em banho maria a 70°C (pH 6.0) antes da adição dos anticorpos. Em seguida, os cortes foram incubados com peróxido de hidrogênio a 3% diluído em metanol para inibição da peroxidase endógena. Após as lavagens, ambos os anticorpos primários foram detectados utilizando anticorpos secundários biotinilados policlonais de coelho anti-rato (1:800; DAKO, Carpinteria, CA), seguida da incubação com estreptavidina conjugada a peroxidase (DAKO). A diaminobenzidina (DAB) foi utilizada como cromógeno. Os cortes foram contrastados com hematoxilina de Dellafield.

Para a quantificação de miofibroblastos, foi realizada a imunomarcção dos cortes com anticorpo contra α -SMA produzida em camundongo como descrito por CARDOSO et al (2007). Antes da inibição da peroxidase endógena, os cortes foram incubados com o sistema Envision (1:60 DAKO) para que houvesse a neutralização de imunoglobulinas inespecíficas de camundongo presentes no tecido. Após lavagens, os cortes foram incubados com uma mistura de anticorpo primário monoclonal contra α -SMA (1:600; DAKO) e sistema Envision

(1:20; DAKO). Diaminobenzidina (DAB) foi utilizada como cromógeno. Os cortes foram contrastados com hematoxilina de Dellafield.

Para quantificação de macrófagos, neutrófilos e miofibroblastos, os cortes foram digitalizados utilizando o escaner de lâminas Panoramic MIDI e foram avaliados 5 campos aleatórios ($14.400 \mu\text{m}^2$) por animal, localizados no tecido de granulação. A quantificação de miofibroblastos foi realizado através da densidade de volume, usando o método estereológico descrito previamente (GUNDERSEN et al., 1988) e os dados foram expressos em ($V_v[\text{myofibroblasts}\%]$). Os dados da quantificação de macrófagos e neutrófilos foram expressos em células por mm^2 .

Todas as análises quantitativas foram feitas com cegamento e repetidas sem diferença entre as replicatas.

7.8 Western blot

A expressão proteica do fator de transcrição NF- κ B foi detectada através da técnica de western blotting. As lesões congeladas foram maceradas em tampão de lise (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 138 mM NaCl, 10% glicerol, 1% Triton X-100, coquetel inibidor de protease P2714 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). A concentração de proteínas totais deste lisado foi determinada através do ácido bicinônico (BCA) (Thermo Fisher Scientific, Rockwood, TN) conforme descrito por SMITH et al (1985). Foram utilizados 50 μg de proteína de cada lisado. As proteínas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio, transferidas para membranas de polivinilideno. Posteriormente, as membranas foram incubadas com anticorpos contra pNF- κ Bp65 (#3031, 65 kDa, 1:100) ou de NF- κ Bp65 (#8242, 65 kDa, 1:100), (Cell Signaling, Beverly, MA) overnight a 4°C. As membranas foram incubadas com anticorpos de cabra anti-rato conjugada com peroxidase de rábano (Santa Cruz Biotechnology, 1: 3000) durante 1h e posteriormente o complexo antígeno-anticorpo foi detectado por quimioluminescência (ClarityTM Western ECL substrato, Bio-RAD, Estados Unidos) e ChemiDocTM sistema XRS (Bio-Rad, Estados Unidos). As bandas foram medidas utilizando o software Image J (National Institutes of Health) e os dados foram expressos como unidades arbitrárias (U.A).

7.9 Citocinas

Os níveis proteicos das citocinas: TNF- β_1 ativo, TNF- α e IL-6 foram medidos no plasma dos animais através da técnica de ELISA utilizando kits comerciais Duo Set kits R&D Systems (Minneapolis, Minnesota, EUA) seguindo as instruções do fabricante.

7.9.1 Análise Estatística

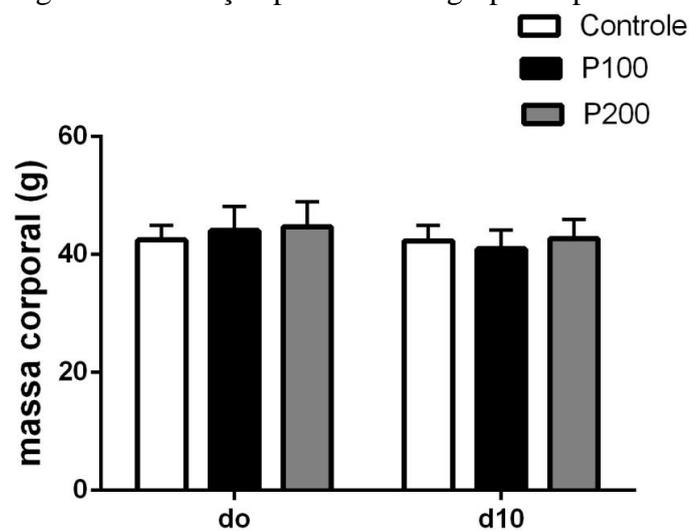
Os dados são expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM), com exceção dos dados de re-epitelização devido ao reduzido número de amostras. Inicialmente os dados foram avaliados segundo a normalidade utilizando Teste D'Agostino-Pearson. Os dados paramétricos (contração de lesão, TGF- β_1 ativo e IL-6) foram analisados utilizando o *one-way* ANOVA com o pós-teste de Sidak. Os dados não paramétricos foram analisados utilizando o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn (vasos sanguíneos, miofibroblastos, infiltrado inflamatório, neutrófilos, macrófagos positivos F4/80 e TNF- α e NF- κ B). Em todas as comparações, $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Todos os dados foram analisados usando o software GraphPadPrism (GraphPadPrism version 6.0, SanDiego, CA).

8 RESULTADOS

8.1 Avaliação da massa corporal dos animais experimentais

Não houve variação na massa corporal dos animais ao longo do experimento.

Figura 6 - Evolução ponderal dos grupos experimentais



Legenda: Avaliação da média de massa corporal dos animais do grupo Controle, P100 e P200, no dia da realização da lesão (d0) e dez dias (d10) após a realização da lesão.

Fonte: A autora, 2016.

8.2 Análises macroscópicas

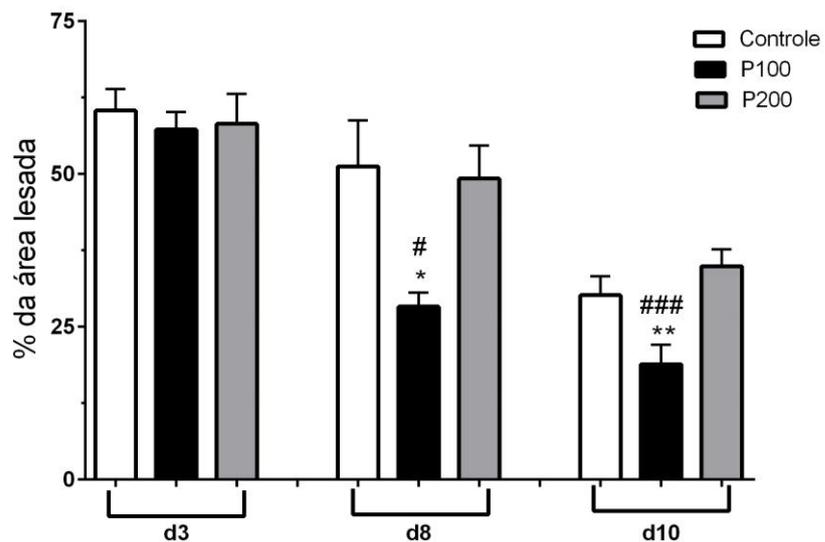
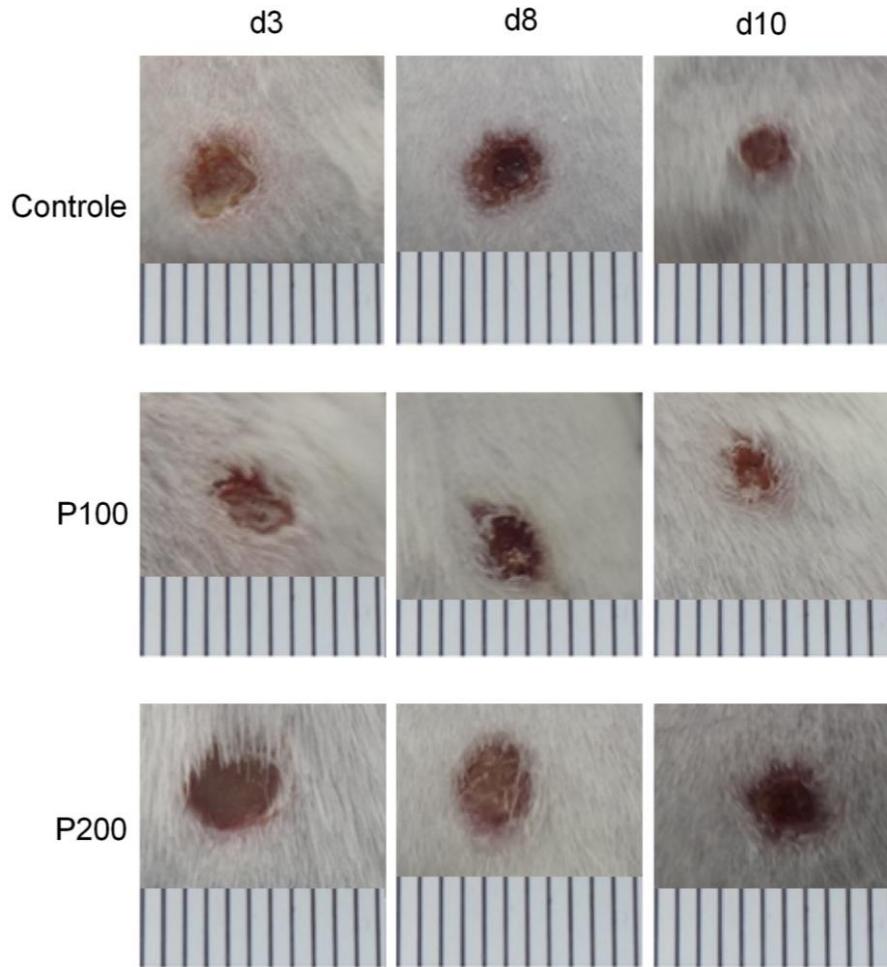
8.2.1 Contração da lesão

Na Fig.7A estão representadas as fotografias das lesões. Conforme observado, três dias (d3) após a realização da lesão não foi evidenciada diferença na contração da lesão entre os grupos estudados. Em contrapartida, oito dias após a lesão foi constatado que grupo P100 apresentou maior contração de lesão quando comparado ao grupo controle e ao grupo P200.

Ao final do experimento (10 dias após a realização da lesão), podemos constatar que o grupo P100 manteve uma melhor taxa de contração de lesão quando comparado ao grupo controle e ao grupo P200 (Fig. 7B).

Figura 7 - Avaliação da contração de lesão.

A



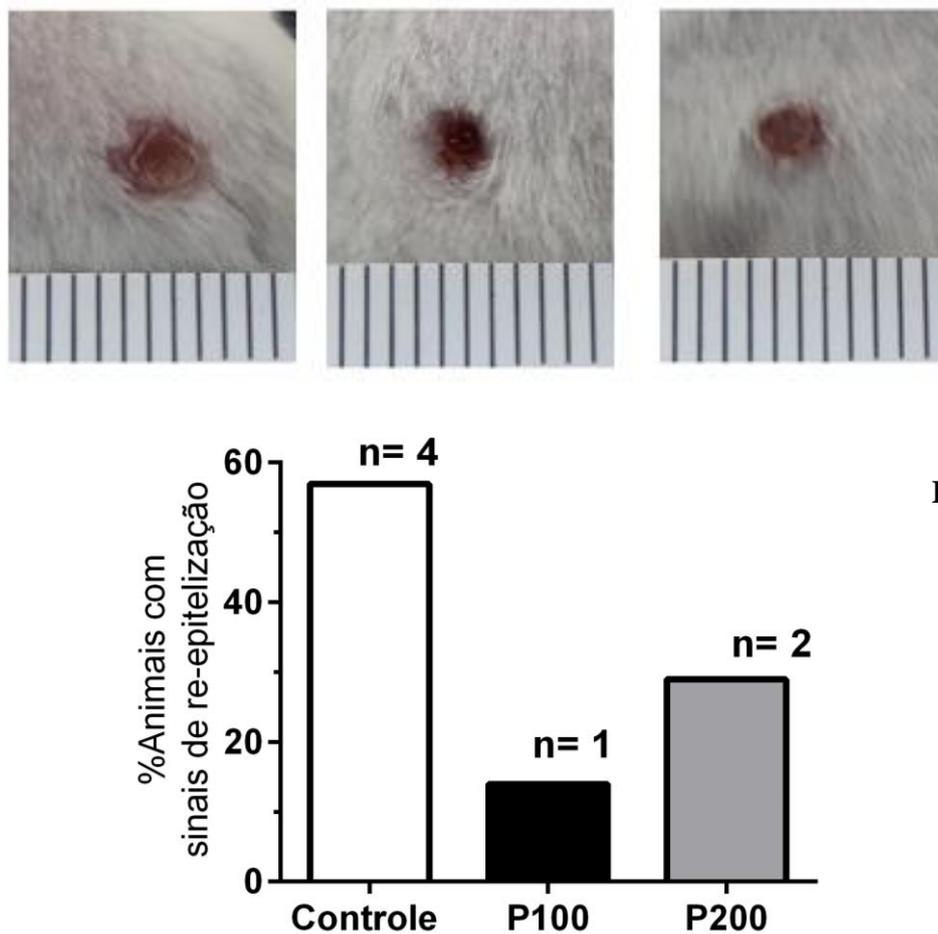
B

Legenda: A) Fotografias das lesões dos grupos tratados com polifenóis da própolis vermelha (P100 e P200) e grupo controle, três dias (d3) após a lesão, oito dias (d8) e dez dias (d10) após a lesão. B) Porcentagem da área inicial da lesão no grupo controle, P100 e P200, em 3 (d3), 8 (d8) e dez dias (d10) após a realização da lesão. Sendo, * a comparação entre grupo Controle Vs P100 e # a comparação entre o grupo P100 Vs P200. Média \pm EPM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ e # $p < 0,05$.
Fonte: A autora, 2016.

8.2.2 Re-epitelização

Com relação aos sinais de re-epitelização, foi constatado que após dez dias de lesão, o grupo controle apresentou quatro animais com sinais de re-epitelização, o grupo P100 um animal apresentou sinais de re-epitelização e no grupo P200 dois animais apresentaram sinais de re-epitelização. (Fig. 8A e 8B).

Figura 8 - Avaliação do processo de re-epitelização



Legenda: A) Fotografia das lesões com presença de tecido de re-epitelização em dez dias após a lesão. B) Número de animais com sinais de re-epitelização em cada grupo.

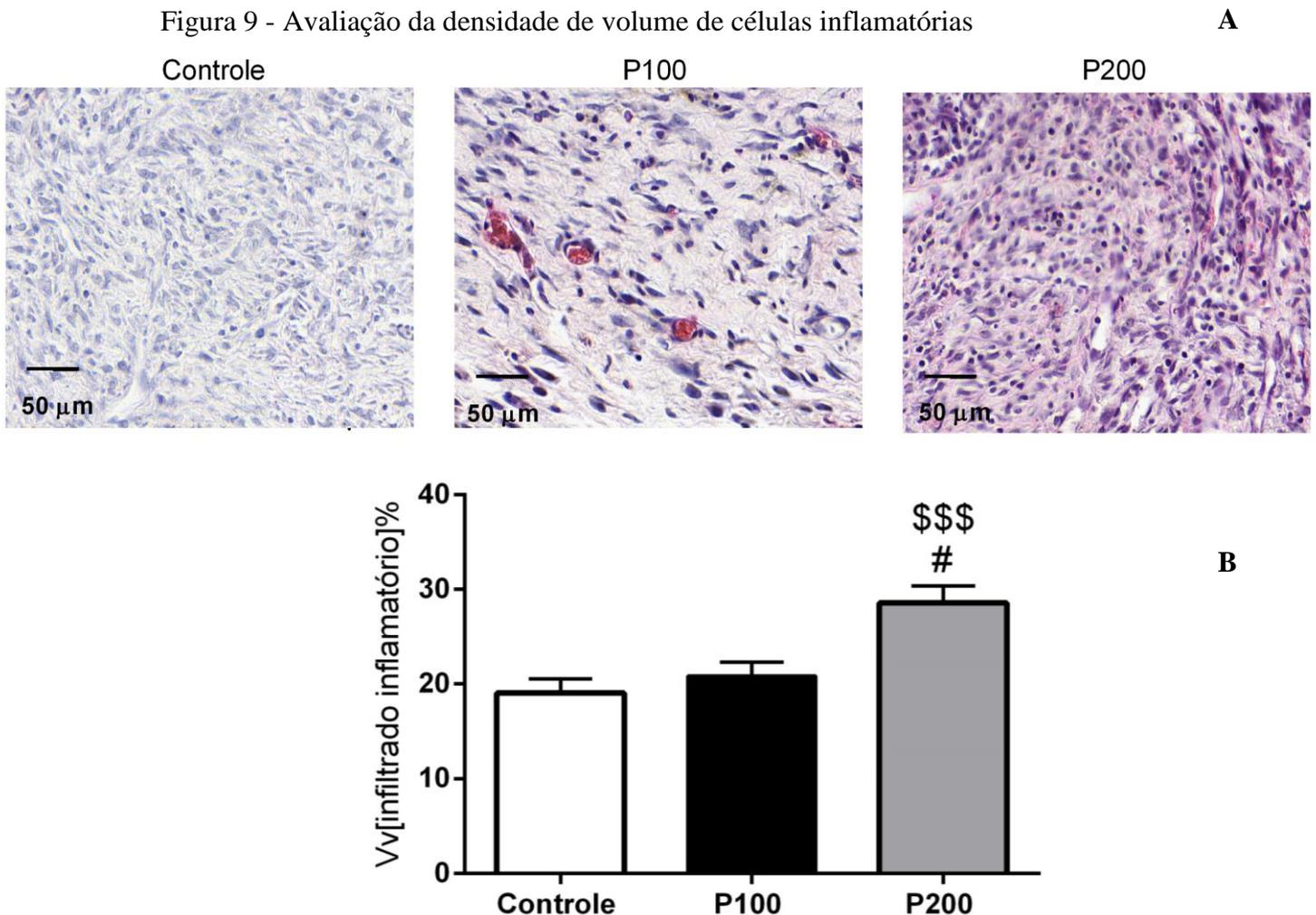
Fonte: A autora, 2016.

8.3 Análises microscópicas

8.3.1 Densidade de volume do infiltrado inflamatório

A quantificação do infiltrado inflamatório foi realizado através das lâminas coradas com hematoxilina e eosina (Fig. 9A). Podemos observar maior densidade de volume (Vv) de células inflamatórias no grupo P200 quando comparado aos outros grupos estudados (Fig. 9B).

Figura 9 - Avaliação da densidade de volume de células inflamatórias

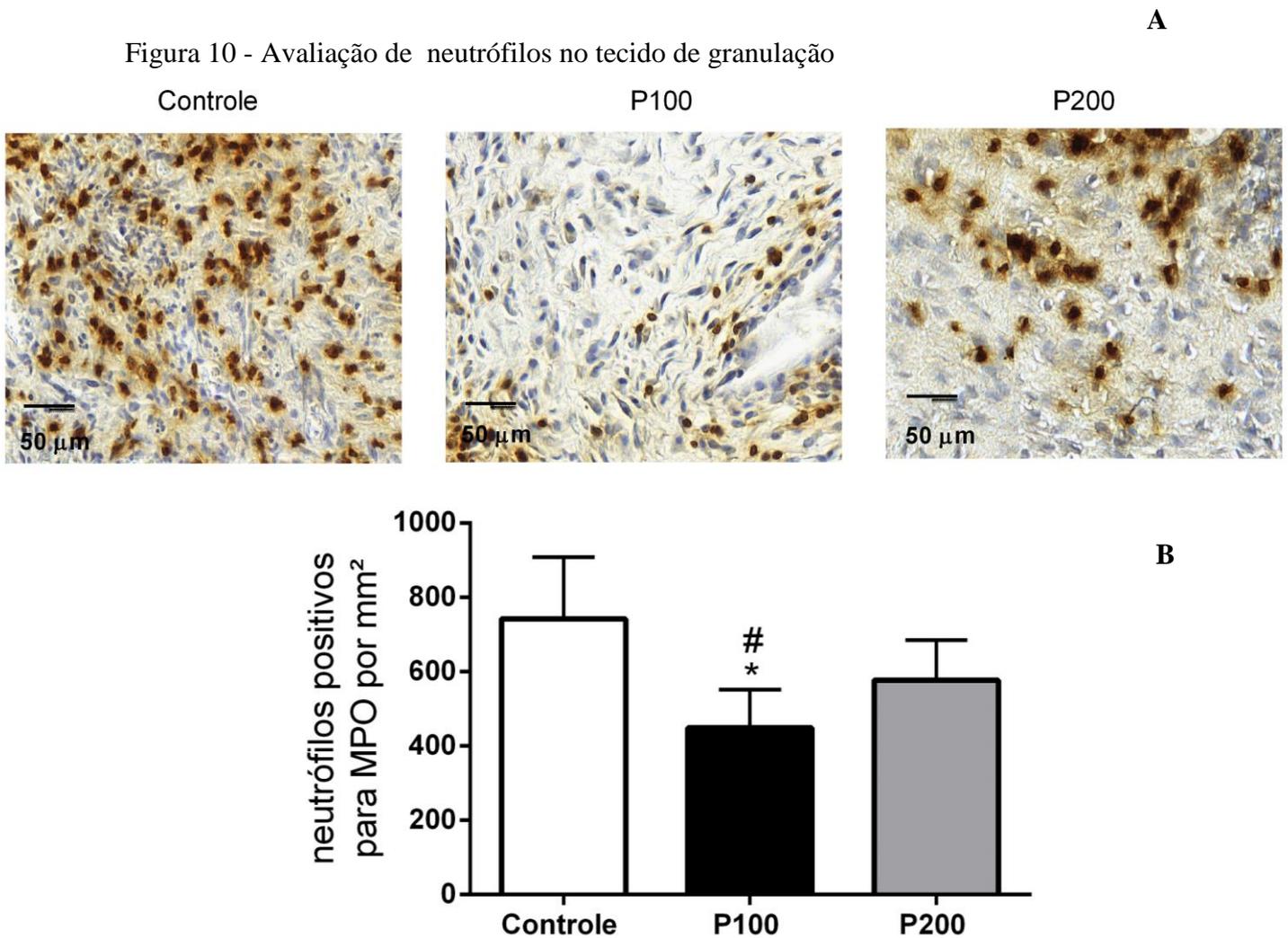


Legenda: A) Imagens representativas do infiltrado inflamatório no grupo controle, P100 e P200, 10 dias após a lesão. B) Vv (densidade de volume) do infiltrado inflamatório no grupo controle, P100 e P200, 10 dias após a realização da lesão. Sendo, \$ a comparação entre grupo Controle Vs grupo P200 e # comparação entre grupo P100 Vs P200. Média ± EPM. #p<0,05 e \$\$\$ p<0,001.

Fonte: A autora, 2016.

8.3.2 Quantificação de Neutrófilos

A figura 10A mostra a imunomarcção de neutrófilos no tecido de granulação dez dias após a realização da lesão. Através da figura 10B, podemos constatar que o grupo P100 possui um menor número de neutrófilos quando comparado ao grupo P200 e ao grupo controle.



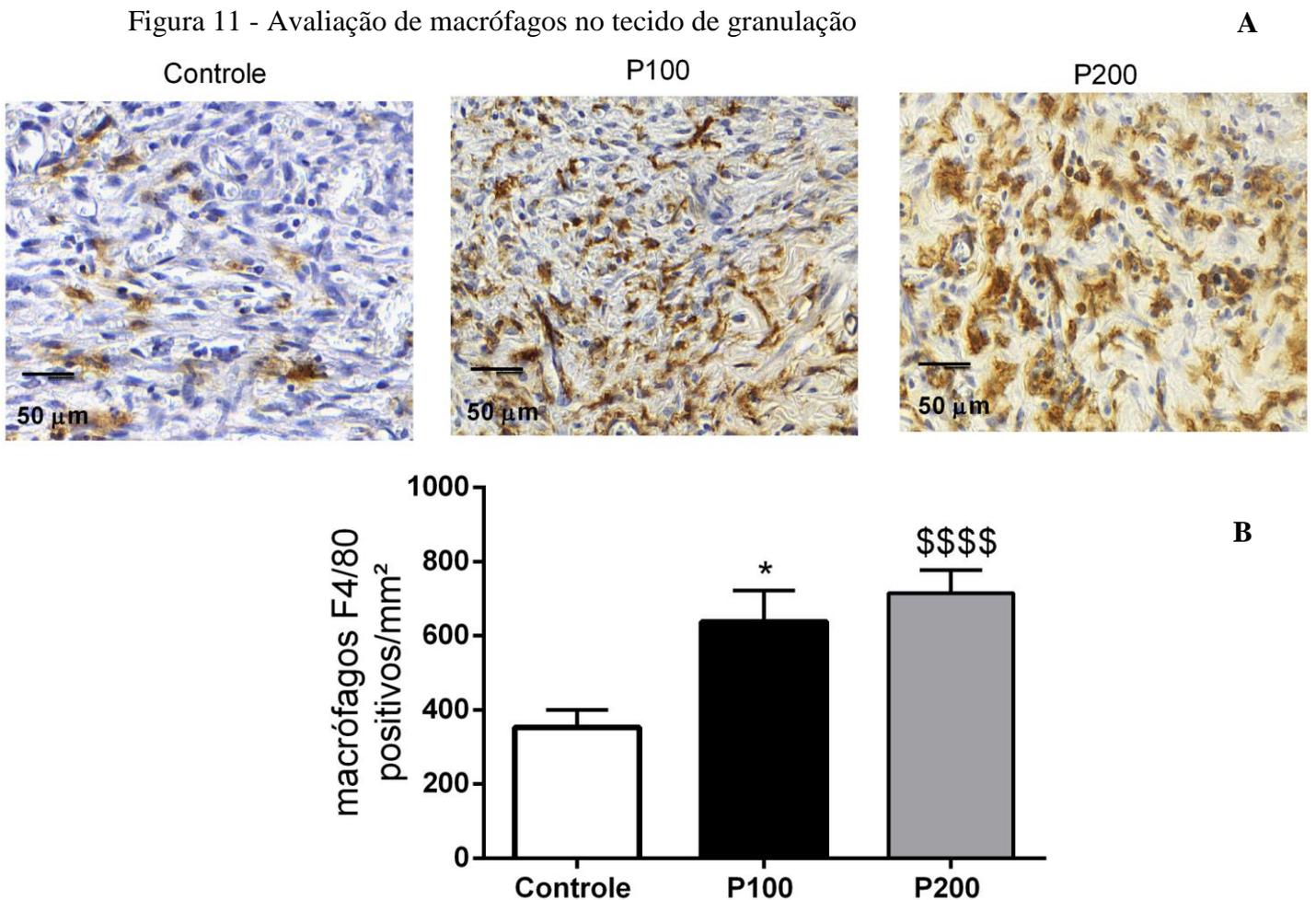
Legenda A) Imagens representativas da imunomarcção de neutrófilos no grupo controle, P100 e P200, 10 dias após a lesão. B) Neutrófilos por mm² nos grupo controle, P100 e P200, 10 dias após a realização da lesão. Sendo, * a comparação entre grupo controle Vs P100 e # a comparação entre grupo P100 Vs P200. Média ± EPM. #p<0,05 e *p<0,05.

Fonte: A autora, 2016.

8.3.3 Quantificação de Macrófagos

A Fig.11A indica a imunomarcagem de macrófagos positivos contra F4/80 no tecido de granulação dez dias após a realização da lesão. Após a quantificação de macrófagos foi possível observar que os grupos P100 e P200 apresentaram maior número de macrófagos quando comparados ao grupo controle (Fig. 11B).

Figura 11 - Avaliação de macrófagos no tecido de granulação



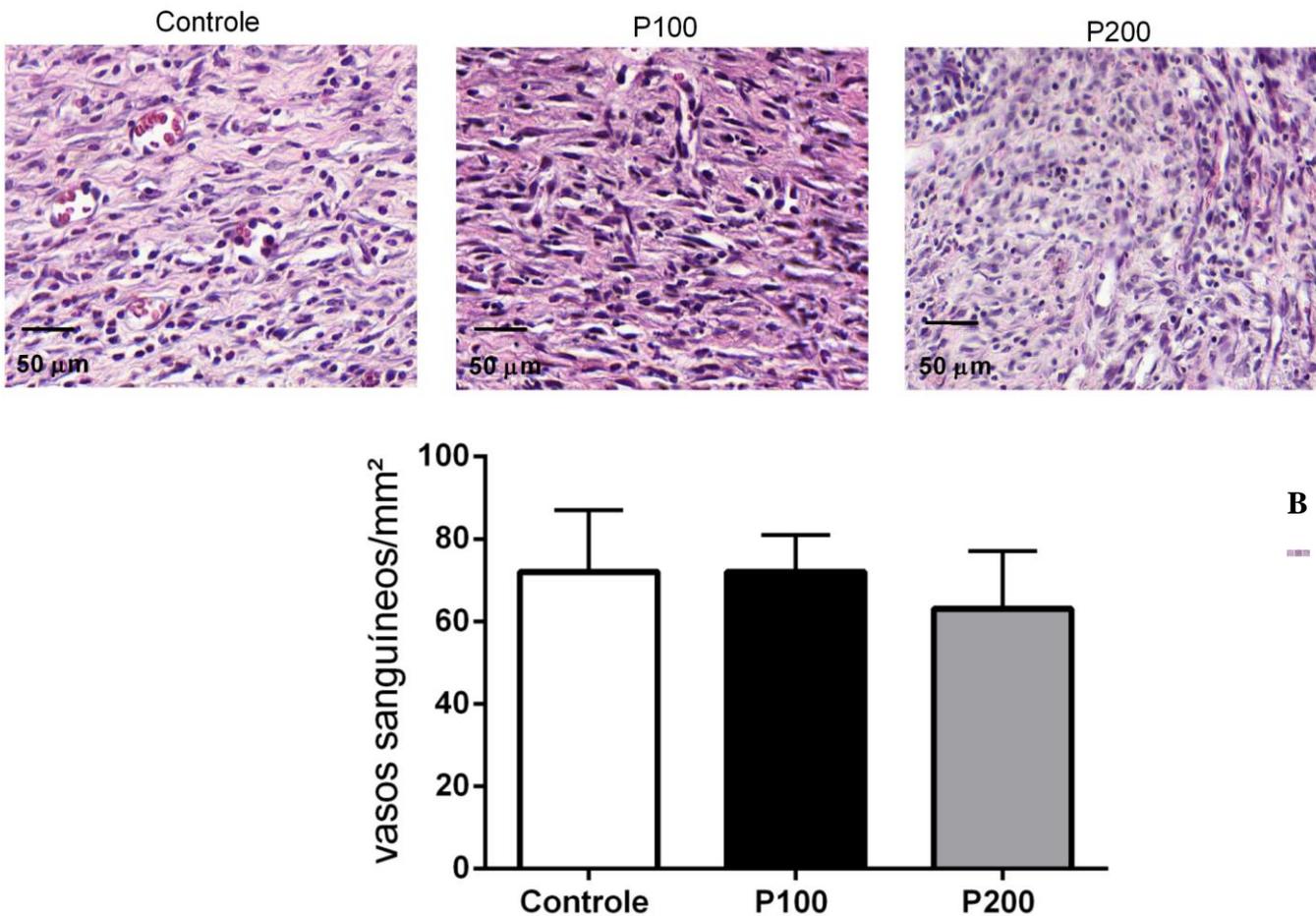
Legenda: A) Imagens representativas da imunomarcagem de macrófagos F4/80 no grupo controle, P100 e P200, 10 dias após a lesão. B) Dados quantitativos de macrófagos F4/80 positivos (cél/m²) no grupo controle, P100 e P200, 10 dias após a lesão. Sendo, * a comparação entre grupo controle Vs P100 e \$ grupo controle Vs grupo P200. Média \pm EPM. * $p < 0,05$ e \$\$\$\$ $p < 0,0001$.

Fonte: A autora, 2016.

8.3.4 Quantificação de vasos sanguíneos

Através da Fig.12A podemos observar a presença de vasos sanguíneos no tecido de granulação dos grupos estudados. Com relação à quantificação de vasos sanguíneos por mm^2 , após a avaliação não foi observado diferença no número de vasos entre os grupos estudados (Fig. 12A e 12B).

Figura 12 - Avaliação de vasos sanguíneos no tecido de granulação



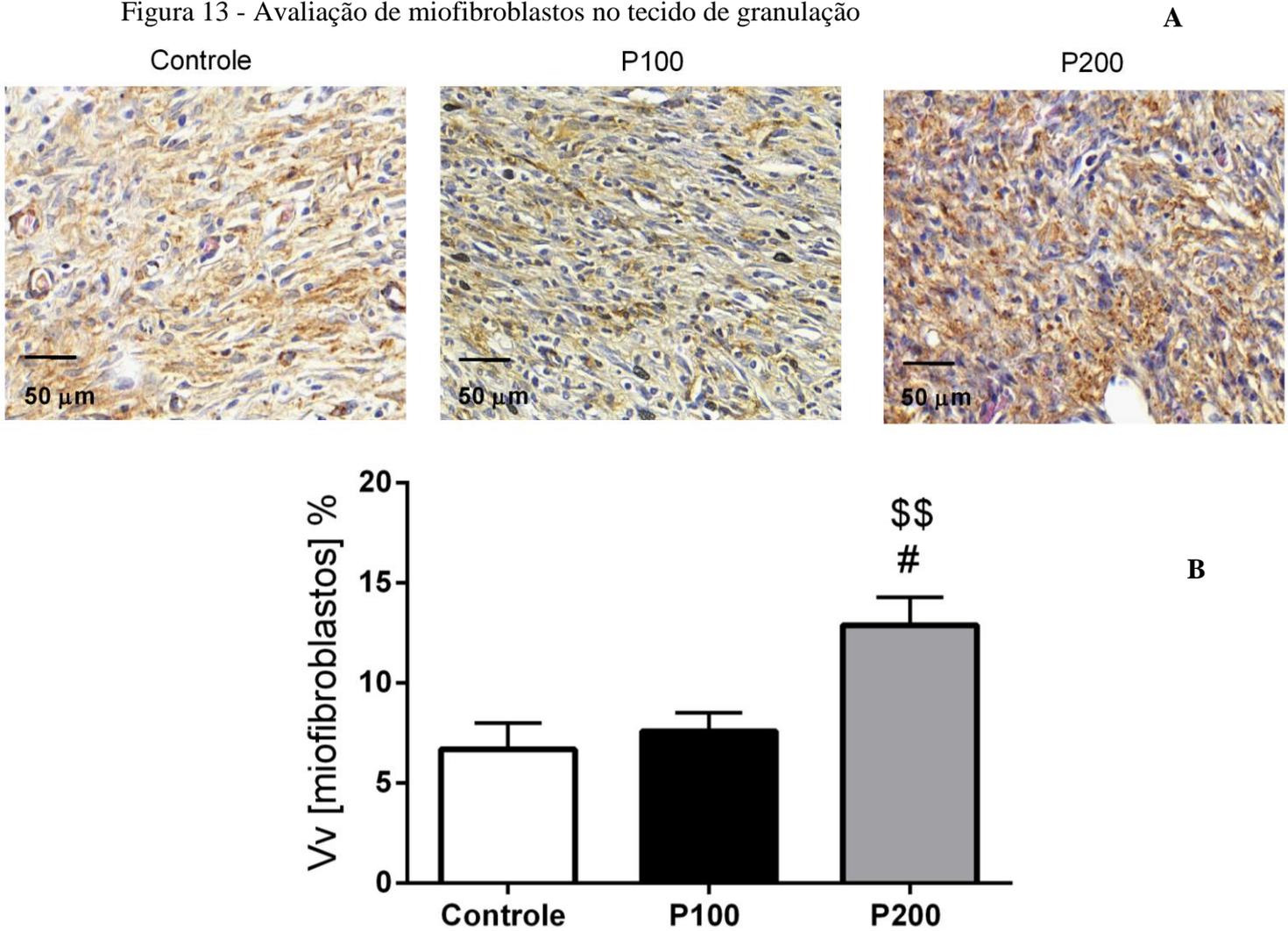
Legenda: A) Imagens representativas da quantificação de vasos sanguíneos no grupo controle, P100 e P200, 10 dias após a lesão. B) Quantificação de vasos sanguíneos em mm^2 no grupo controle, P100 e P200 10 dias após a realização da lesão.

Fonte: A autora, 2016.

8.3.5 Densidade de volume de miofibroblastos

Após a quantificação, foi observado que o grupo P200 apresentou maior número de miofibroblastos quando comparado ao grupo controle e ao grupo P100.

Figura 13 - Avaliação de miofibroblastos no tecido de granulação



Legenda: A) Imagens representativas da imunomarcção de α -actina de músculo liso no grupo controle, P100 e P200, 10 dias após a lesão. B) Dados quantitativos da densidade de volume de miofibroblastos (Vv) no grupo controle, P100 e P200, 10 dias após a lesão. Sendo, \$ a comparação entre grupo Controle Vs P200 e # grupo P100 Vs P200. Média \pm EPM. \$\$ $p < 0,01$ e # $p < 0,05$.

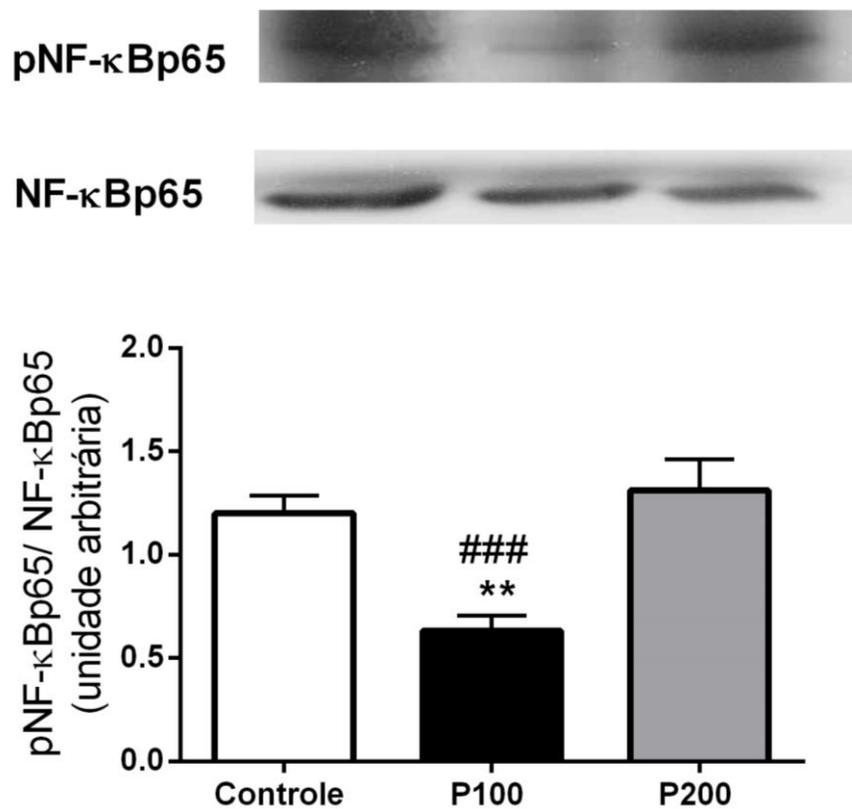
Fonte: A autora, 2016.

8.4 Análises biomoleculares

8.4.1 Expressão do fator de transcrição NF- κ B

A expressão do fator de transcrição NF- κ B fosforilado foi menor no grupo P100 quando comparado o grupo controle e ao grupo P200, dez dias após a lesão (Fig.14).

Figura 14 Avaliação da expressão proteica do NF- κ B/ NF- κ B total.



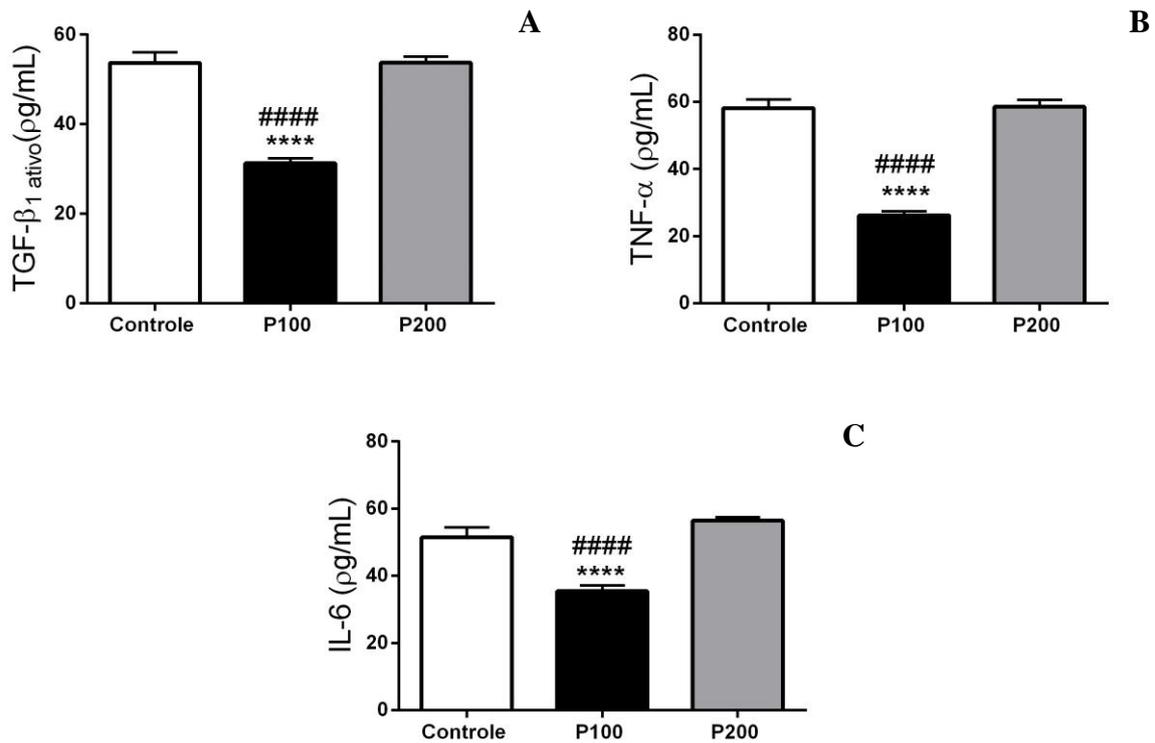
Legenda: Expressão do fator transcrição NF- κ B nos grupos controle, P100 e P200, dez dias após a lesão. . Sendo, *a comparação entre grupo Controle Vs P100 e # grupo P100 Vs P200. Média \pm EPM. ** $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$.

Fonte: A autora, 2016.

8.4.2 Citocinas inflamatórias

Foi constatado que o grupo P100 apresentou menores níveis de TGF- β_1 ativo, TNF- α e IL-6 quando comparado ao controle e ao grupo P200 no plasma.

Figura 15 - Avaliação das citocinas



Legenda: A) Quantificação de TGF- β_1 ativo (pg/mL) no grupo controle, P100 e P200, dez (10) dias após a lesão B) Quantificação de TNF- α (pg/mL) no grupo controle, P100 e P200, dez (10) após a lesão C) Quantificação de IL-6 (pg/mL) no grupo controle, P100 e P200, dez (10) após a lesão. Sendo, **** a comparação entre grupo Controle Vs P100 e # grupo P100 Vs P200. Média \pm EPM ****p<0,0001, ####p<0,0001.

Fonte: A autora, 2016.

9 DISCUSSÃO

Recentemente pesquisadores têm investigado a composição química de diferentes tipos de própolis e suas ações biológicas (BANKOVA et al., 2014; BENKOVIC et al., 2009; DOĞANYIĞIT et al., 2013, 2013; NOLKEMPER et al., 2010). A própolis vermelha brasileira também tem sido alvo de diversas pesquisas tendo como foco a atividade biológica da mesma (ALENCAR et al., 2007; DA COSTA et al., 2015; DALEPRANE; ABDALLA, 2013; IIO et al., 2010, 2012; JACOB et al., 2015; TELES et al., 2015).

É bem documentada a existência de uma ampla variedade de compostos fenólicos na própolis vermelha em comparação com outros tipos de própolis, tais como ácido p-cumárico, flavonóis, chalconas, isoflavonóides, pterocarpanos, isoflavonasmtoxilados, triterpenóides e guttiferona (ALENCAR et al., 2007; BANKOVA, 2005; MACHADO et al., 2016; SILVA et al., 2008). Os compostos fenólicos são as principais substâncias responsáveis pelos efeitos biológicos da própolis como: anti-inflamatório (DE MOURA et al., 2011; MIRZOEVA; CALDER, 1996; ORSATTI et al., 2010; SFORCIN, 2007; SILVA et al., 2012), antioxidante (ALENCAR et al., 2007; BANKOVA, 2005; BORRELLI; IZZO, 2000; DALEPRANE; ABDALLA, 2013) e imunomodulador (AL GHAMDI et al., 2015; DE MOURA et al., 2011; HOZZEIN et al., 2015; SFORCIN, 2007). Neste estudo, a hipótese de que o tratamento oral com PPV brasileira pode ser útil no reparo tecidual de feridas é baseada em suas altas concentrações de compostos fenólicos documentado em estudos prévios (DE ALMEIDA et al., 2013; HOZZEIN et al., 2015).

Entre os eventos ocorridos no reparo tecidual, temos a contração da lesão e a re-epitelização. Entre os modelos *in vivo* utilizados para estudar o processo de reparo tecidual estão: porcos, sapos, ratos e camundongos. O modelo que mais mimetiza o processo de reparo tecidual em humanos, é o modelo suíno, pois neste modelo o processo de reparo acontece predominantemente através da re-epitelização. Em contrapartida, diversos estudos utilizam roedores (camundongos e ratos) por questões logísticas, acomodação, manutenção, tempo de gestação, manuseio e por existir muitas linhagens transgênicas disponíveis. Embora o processo de reparo em roedores ocorra de modo diferente do que em humanos (neste modelo animal a reparação ocorre mais rapidamente e predominantemente através da contração da lesão ao invés da re-epitelização) este modelo é o mais utilizado em estudos de reparo tecidual (ANSELL; HOLDEN; HARDMAN, 2012). Em nosso estudo foi visto que em d8 e d10, o grupo P100 teve uma maior contração de lesão quando comparado ao grupo controle e ao

grupo P200. Em d8 o grupo P200 teve contração de lesão semelhante ao grupo controle, porém em d10 o mesmo teve uma menor taxa de contração de lesão quando comparado ao grupo controle.

No início da fase inflamatória, a degranulação de plaquetas estimula a liberação de fatores de crescimento e quimioatrativos. Entre as citocinas presentes nesta fase, o TNF- α e a IL-1 são responsáveis por estimular um fator de transcrição nuclear responsável por regular diversos genes que controlam a resposta inflamatória em várias doenças (BALDWIN, 1996). O fator de transcrição nuclear NF- κ B quando estimulado, é fosforilado e translocado para o núcleo. Devido o papel do NF- κ B na expressão de outros genes pró-inflamatórios, incluindo citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão, o mesmo tem sido estudado extensivamente (LAWRENCE, 2009). Um dos mecanismos que podem justificar o efeito anti-inflamatório da própolis é a inibição da expressão do fator de transcrição NF- κ B. Sendo assim, através do nosso estudo foi possível constatar que o tratamento diário com PPV na concentração de 100 mg/kg foi capaz de reduzir a expressão proteica do fator de transcrição NF- κ B fosforilado. Este resultado está de acordo com os níveis reduzidos de TNF- α e IL-6 no grupo P100 quando comparado ao grupo controle e ao grupo P200, justificando a boa evolução no processo de reparo tecidual encontrado neste grupo.

Um tratamento diário com o extrato hidroalcoólico da própolis (100 mg/kg) durante um mês atenuou o estresse oxidativo, inflamação, proliferação e migração de linfócitos em camundongos diabéticos (AL GHAMDI et al., 2015). Além disso, foi visto que a aplicação diária de própolis sobre lesões diabéticas, em camundongos foi capaz de melhorar a contração da lesão e reduzir os níveis de citocinas IL-1 β , IL-6, TNF- α e MMP-9 (HOZZEIN et al., 2015).

Com a liberação de citocinas e fatores quimioatrativos há também a atração de células inflamatórias para o local da lesão, entre elas os neutrófilos e macrófagos possuem grande atuação no reparo tecidual (GANTWERKER; HOM, 2011; SINGER; CLARK, 1999). Primeiramente quantificamos as células inflamatórias presentes no tecido de granulação, para posteriormente avaliar o perfil destas células inflamatórias. Realizamos a quantificação do infiltrado inflamatório através do método estereológico, e através deste foi possível verificar que o grupo P200 apresentou maior densidade de volume de infiltrado inflamatório quando comparado ao grupo controle e ao grupo P100. Segundo COTRAN; ED, (2000), a inflamação até determinado grau é necessária para que haja um adequado reparo tecidual, porém uma reação inflamatória exacerbada pode prejudicar o processo de reparo tecidual cutâneo por favorecer a promoção de quantidade excessiva de exsudato, edema, deiscência e crescimento

bacteriano. Deste modo o processo de contração da lesão no grupo P200 em d10, pode ser justificado pelo excessivo número de células inflamatórias.

Com relação aos neutrófilos, foi observado que o grupo P100 apresentou menor número destas células quando comparado ao grupo controle e ao grupo P200 (d10). Caso a lesão não esteja infectada, o influxo de neutrófilos cessará em poucos dias, e o prolongamento da presença destas células no local da lesão pode atrasar o reparo (MARTIN, 1997). Sendo assim, este dado indica um avanço no processo de reparo encontrado no grupo P100 quando comparado ao grupo controle e ao grupo P200. Em um estudo recente, a inibição da migração de neutrófilos foi atribuída à presença do vestitol, um isoflavonóide presente na própolis vermelha brasileira (FRANCHIN et al., 2016). Apesar do atraso na contração da lesão encontrado no grupo P200 em d10, através do estudo mencionado anteriormente, a menor concentração de neutrófilos pode ser justificado pela atuação inibitória de neutrófilos do vestitol encontrado na própolis vermelha brasileira.

Devido à liberação de fatores quimioatrativos (TGF- β , fragmentos proteicos de matriz extracelular e MCP-1 entre outros) os monócitos migram para o local da lesão e ao chegar ao local diferenciam-se em macrófagos ativados (SINGER; CLARK, 1999). Os macrófagos atuam regulando a fase inflamatória do reparo, fagocitando e digerindo organismos patogênicos, removendo os detritos teciduais e destruindo neutrófilos remanescentes. Estas células também liberam fatores de crescimento no local da lesão, entre eles podemos destacar: o TGF- β e o VEGF (LI; CHEN; KIRSNER, 2007). Deste modo, os macrófagos atuam na resolução da inflamação e desempenham importante papel na transição entre a fase inflamatória e a fase proliferativa, exercendo assim significativa influência no processo de reparo (GURTNER et al., 2008; LI; CHEN; KIRSNER, 2007; SINGER; CLARK, 1999). Através da imunohistoquímica foi verificado que em d10, o grupo P100 e P200 teve maior concentração de macrófagos quando comparado ao grupo controle. Segundo MARTIN (1997) a redução do número de macrófagos durante a fase inflamatória pode atrasar o reparo de lesões.

A diferenciação miofibroblástica é realizada através da ação do TGF- β_1 sintetizado principalmente pelos macrófagos. Os fibroblastos são estimulados a adquirir a expressão de α -SMA através do TGF- β_1 e se diferenciam em miofibroblastos. Estas células sintetizam e depositam componentes da matriz extracelular e possuem propriedades contráteis, desempenhando um papel importante na contração dos bordos da lesão e maturação do tecido de granulação (DARBY et al., 2014; SINGER; CLARK, 1999).

O efeito antiangiogênico da própolis vermelha foi associada à presença do flavonóide Artepillin C e do CAPE (fenil éster do ácido caféico). Uma das justificativas seria que a Artepillin C atuaria suprimindo a angiogênese tanto *in vivo* como em modelos *in vitro*, enquanto CAPE atuaria inibindo MMP-2, MMP-9, e a atividade do VEGF (DALEPRANE; ABDALLA, 2013). Em nosso estudo não foi verificado que PPV não alterou o número de vasos.

A diferenciação miofibroblástica é realizada através da ação do TGF- β_1 sintetizado pelos macrófagos. Os fibroblastos são estimulados a adquirir a expressão de α -SMA através do TGF- β_1 e se diferenciam em miofibroblastos. Estas células sintetizam e depositam componentes da matriz extracelular e possuem propriedades contráteis, desempenhando um papel importante na contração dos bordos da lesão e maturação do tecido de granulação (DARBY et al., 2014; SINGER; CLARK, 1999).

Foi possível verificar uma menor concentração de TGF- β no grupo P100 quando comparado ao grupo controle e ao grupo P200. Com relação a presença de miofibroblastos, verificamos que o grupo P100 apresentou menor densidade de volume quando comparado ao grupo P200, este dado corrobora com a menor concentração de TGF- β encontrado e melhor estado evolutivo do reparo no grupo P100. Com relação a maior concentração de miofibroblastos no grupo P200 em comparação ao grupo P100, a mesma pode ser justificada pela menor evolução no processo de reparo, refletido pela transição da fase inflamatória para fase proliferativa, no qual macrófagos estão produzindo TGF- β para diferenciar os fibroblastos em miofibroblastos e assim obter contração de bordos da lesão. Em experimento onde diferentes tipos de própolis foram utilizadas sobre lesões provenientes de queimaduras, verificou que o grupo tratado com extrato hidroalcolólico da própolis vermelha, em uso tópico, apresentou maior quantidade de miofibroblastos quando comparado ao grupo controle e ao grupo tratado com própolis verde (DE ALMEIDA et al. 2013). Ao comparar o grupo P200 ao grupo controle a maior concentração de miofibroblastos encontrada no grupo P200 pode ser justificado pelo atraso no processo de reparo.

Diante do exposto o tratamento com 100 mg/kg ao dia proporcionou um efeito cicatrizante, podendo ser atribuído à menor concentração de citocinas pró-inflamatórias entre elas: TNF- α e IL-6, menor expressão de NF- κ B, melhor modulação do perfil de células inflamatórias (menor concentração de neutrófilos), resultando em melhor evolução no processo de reparo constatado através da melhor taxa de contração de lesão no grupo P100.

Apesar da concentração de 200 mg/kg/dia ser utilizada em outros estudos prévios (DALEPRANE et al., 2012; RODRIGUES et al., 2009), verificamos que este grupo se

comportou de modo semelhante ao grupo controle, porém o tratamento com 200 mg/kg/dia de PPV interferiu em alguns parâmetros, como por exemplo, maior concentração de macrófagos e maior concentração de miofibroblastos, quando comparado ao grupo controle. Diante do exposto, a melhor atuação do grupo P100 no processo de reparo tecidual pode ser justificada pelo aproveitamento das propriedades benéficas dos polifenóis da própolis vermelha em determinados eventos do reparo tecidual na concentração de 100 mg/kg/dia.

CONCLUSÃO

De acordo com nosso estudo, a administração oral de polifenóis da própolis vermelha brasileira na dose de 100 mg/kg/dia pode exercer importante papel como um agente eficiente no processo de reparo de lesões através da redução de marcadores inflamatórios entre eles: NF- κ B, TNF- α , IL-6 e TGF- β ₁ com consequente redução do tempo de reparo de lesões agudas em modelo murino. Já a concentração de 200 mg/kg/dia não foi efetivo no processo de reparo tecidual cutâneo em modelo murino de lesão tecidual.

REFERÊNCIAS

- ADELMANN, J. et al. Exotic flora dependence of an unusual Brazilian propolis: the pinocembrin biomarker by capillary techniques. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 43, n. 1, p. 174–178, 4 jan. 2007.
- ALENCAR, S. M. et al. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, n. 2, p. 278–283, 5 set. 2007.
- AL GHAMDI, A. A. et al. Oral supplementation of diabetic mice with propolis restores the proliferation capacity and chemotaxis of B and T lymphocytes towards CCL21 and CXCL12 by modulating the lipid profile, the pro-inflammatory cytokine levels and oxidative stress. **BMC immunology**, v. 16, p. 54, 2015.
- ANSELL, D. M.; HOLDEN, K. A.; HARDMAN, M. J. Animal models of wound repair: Are they cutting it? **Experimental Dermatology**, v. 21, n. 8, p. 581–585, ago. 2012.
- ASO, K. et al. Inhibitory effect of propolis on the growth of human leukemia U937. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 5, p. 727–730, maio 2004.
- BAEUERLE, P. A.; BALTIMORE, D. NF-kappa B: ten years after. **Cell**, v. 87, n. 1, p. 13–20, 4 out. 1996.
- BALDWIN, A. S. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. **Annual Review of Immunology**, v. 14, p. 649–683, 1996.
- BANKOVA, V. Recent trends and important developments in propolis research. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM**, v. 2, n. 1, p. 29–32, mar. 2005.
- BANKOVA, V. et al. Chemical composition of Propolis Extract ACF® and activity against herpes simplex virus. **Phytomedicine**, v. 21, n. 11, p. 1432–1438, set. 2014.
- BANSKOTA, A. H.; TEZUKA, Y.; KADOTA, S. Recent progress in pharmacological research of propolis. **Phytotherapy research: PTR**, v. 15, n. 7, p. 561–571, nov. 2001.
- BARBOSA, M. H. et al. Ação terapêutica da própolis em lesões cutâneas. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 22, n. 3, jun. 2009.
- BENGMARK, S.; MESA, M. D.; GIL, A. Plant-derived health: the effects of turmeric and curcuminoids. **Nutrición Hospitalaria**, v. 24, n. 3, p. 273–281, jun. 2009.

- BENKOVIC, V. et al. Evaluation of radioprotective effects of propolis and its flavonoid constituents: in vitro study on human white blood cells. **Phytotherapy research: PTR**, v. 23, n. 8, p. 1159–1168, ago. 2009.
- BORRELLI, F.; IZZO, A. A. The plant kingdom as a source of anti-ulcer remedies. **Phytotherapy research: PTR**, v. 14, n. 8, p. 581–591, dez. 2000.
- BROUGHTON, G.; JANIS, J. E.; ATTINGER, C. E. Wound healing: an overview. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 117, n. 7 Suppl, p. 1e–S–32e–S, jun. 2006.
- BÚFALO, M. C. et al. Propolis and its constituent caffeic acid suppress LPS-stimulated pro-inflammatory response by blocking NF- κ B and MAPK activation in macrophages. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 149, n. 1, p. 84–92, 26 ago. 2013.
- BURDOCK, G. A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). **Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 36, n. 4, p. 347–363, abr. 1998.
- CARDOSO, J. F. et al. Effects of cigarette smoke in mice wound healing is strain dependent. **Toxicologic Pathology**, v. 35, n. 7, p. 890–896, dez. 2007.
- CASTALDO, S.; CAPASSO, F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia**, v. 73 Suppl 1, p. S1–6, nov. 2002.
- CHANG, F. et al. Involvement of PI3K/Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: a target for cancer chemotherapy. **Leukemia**, v. 17, n. 3, p. 590–603, mar. 2003.
- CHEN, D. F. et al. Two new lignans, interiotherins A and B, as anti-HIV principles from *Kadsura interior*. **Journal of Natural Products**, v. 59, n. 11, p. 1066–1068, nov. 1996.
- COTRAN, R. S.; ED. **Robbins patologia estrutural e funcional**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.
- CUNHA, A. P. DA. **Farmacognosia e fitoquímica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2009.
- DA COSTA, M. F. B. et al. Red propolis ameliorates ischemic-reperfusion acute kidney injury. **Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology**, v. 22, n. 9, p. 787–795, 15 ago. 2015.
- DALEPRANE, J. B. et al. Anti-atherogenic and anti-angiogenic activities of polyphenols from propolis. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 23, n. 6, p. 557–566, jun. 2012.

- DALEPRANE, J. B.; ABDALLA, D. S. Emerging roles of propolis: antioxidant, cardioprotective, and antiangiogenic actions. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM**, v. 2013, p. 175135, 2013.
- DARBY, I. A. et al. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**, v. 7, p. 301–311, 2014.
- DA SILVA CUNHA, I. B. et al. Antitrypanosomal activity of Brazilian propolis from *Apis mellifera*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 52, n. 5, p. 602–604, maio 2004.
- DAS NEVES, M. V. M. et al. Isoflavone formononetin from red propolis acts as a fungicide against *Candida* sp. **Brazilian Journal of Microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]**, v. 47, n. 1, p. 159–166, mar. 2016.
- DE ALMEIDA, E. B. et al. The incorporation of Brazilian propolis into collagen-based dressing films improves dermal burn healing. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 147, n. 2, p. 419–425, 20 maio 2013.
- DE MENDONÇA, I. C. G. et al. Brazilian red propolis: phytochemical screening, antioxidant activity and effect against cancer cells. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 15, p. 357, 2015.
- DE MOURA, S. A. L. et al. Brazilian green propolis inhibits inflammatory angiogenesis in a murine sponge model. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM**, v. 2011, p. 182703, 2011.
- DESMOULIÈRE, A. et al. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. **The American Journal of Pathology**, v. 146, n. 1, p. 56–66, jan. 1995.
- DOĞANYIĞIT, Z. et al. Protective effects of propolis on female rats' histopathological, biochemical and genotoxic changes during LPS induced endotoxemia. **Phytomedicine**, v. 20, n. 7, p. 632–639, maio 2013.
- DOLCET, X. et al. NF-κB in development and progression of human cancer. **Virchows Archiv: An International Journal of Pathology**, v. 446, n. 5, p. 475–482, maio 2005.
- DOS SANTOS, C.; RIBEIRO, A. Apicultura uma alternativa na busca do desenvolvimento sustentável. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*. v. 4, n. 3, p. 01–06, jul. 2009.
- DOU, Q. P. Molecular mechanisms of green tea polyphenols. **Nutrition and Cancer**, v. 61, n. 6, p. 827–835, 2009.
- EVANS, W. C.; EVANS, D.; TREASE, G. E. **Trease and Evans pharmacognosy**. 16th ed ed. Edinburgh ; New York: Saunders/Elsevier, 2009.

FRANCHIN, M. et al. Vestitol Isolated from Brazilian Red Propolis Inhibits Neutrophils Migration in the Inflammatory Process: Elucidation of the Mechanism of Action. **Journal of Natural Products**, 3 mar. 2016.

FRANCO, D. G. Fator de transcrição nuclear kappa B no sistema nervoso central: do fisiológico ao patológico. **Revista da Biologia**, v. 4, p. 35–39, jun. 2010.

FREINKEL, R. K.; WOODLEY, D. (EDS.). **The biology of the skin**. New York: Parthenon Pub. Group, 2001.

FREIRES, I. A.; DE ALENCAR, S. M.; ROSALEN, P. L. A pharmacological perspective on the use of Brazilian Red Propolis and its isolated compounds against human diseases. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 110, p. 267–279, 3 mar. 2016.

GANTWERKER, E. A.; HOM, D. B. Skin: histology and physiology of wound healing. **Facial Plastic Surgery Clinics of North America**, v. 19, n. 3, p. 441–453, ago. 2011.

GANTWERKER, E. A.; HOM, D. B. Skin: histology and physiology of wound healing. **Clinics in Plastic Surgery**, v. 39, n. 1, p. 85–97, jan. 2012.

GHISALBERTI, E. L. Propolis: A Review. **Bee World**, v. 60, n. 2, p. 59–84, jan. 1979.

GILMORE, T. D. The Rel/NF-kappaB signal transduction pathway: introduction. **Oncogene**, v. 18, n. 49, p. 6842–6844, 22 nov. 1999.

GONÇALVES, L. S. **50 anos de abelhas africanizadas no Brasil**. . In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA. Aracaju, SE: 2006

GUNDERSEN, H. J. et al. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. **APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica**, v. 96, n. 5, p. 379–394, maio 1988.

GURTNER, G. C. et al. Wound repair and regeneration. **Nature**, v. 453, n. 7193, p. 314–321, 15 maio 2008.

HAYACIBARA, M. F. et al. In vitro and in vivo effects of isolated fractions of Brazilian propolis on caries development. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 101, n. 1-3, p. 110–115, 3 out. 2005.

HOZZEIN, W. N. et al. Topical application of propolis enhances cutaneous wound healing by promoting TGF-beta/Smad-mediated collagen production in a streptozotocin-induced type I diabetic mouse model. **Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology**, v. 37, n. 3, p. 940–954, 2015.

- HU, F. et al. Effects of ethanol and water extracts of propolis (bee glue) on acute inflammatory animal models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 3, p. 276–283, 14 set. 2005.
- IIO, A. et al. Ethanolic extracts of Brazilian red propolis promote adipocyte differentiation through PPAR γ activation. **Phytomedicine**, v. 17, n. 12, p. 974–979, out. 2010.
- IIO, A. et al. Ethanolic extracts of Brazilian red propolis increase ABCA1 expression and promote cholesterol efflux from THP-1 macrophages. **Phytomedicine**, v. 19, n. 5, p. 383–388, mar. 2012.
- INUI, S. et al. Identification of the phenolic compounds contributing to antibacterial activity in ethanol extracts of Brazilian red propolis. **Natural Product Research**, v. 28, n. 16, p. 1293–1296, 2014.
- JACOB, A. et al. The effects of Malaysian propolis and Brazilian red propolis on connective tissue fibroblasts in the wound healing process. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 15, p. 294, 2015.
- KHAYYAL, M. T.; EL-GHAZALY, M. A.; EL-KHATIB, A. S. Mechanisms involved in the antiinflammatory effect of propolis extract. **Drugs Under Experimental and Clinical Research**, v. 19, n. 5, p. 197–203, 1993.
- KOO, H. et al. Effect of *Apis mellifera* propolis from two Brazilian regions on caries development in desalivated rats. **Caries Research**, v. 33, n. 5, p. 393–400, out. 1999.
- KOO, H. et al. In vitro antimicrobial activity of propolis and *Arnica montana* against oral pathogens. **Archives of Oral Biology**, v. 45, n. 2, p. 141–148, fev. 2000.
- KUMAZAWA, S.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. **Food Chemistry**, v. 84, n. 3, p. 329–339, fev. 2004.
- LAWRENCE, T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 1, n. 6, p. a001651, dez. 2009.
- LI, J.; CHEN, J.; KIRSNER, R. Pathophysiology of acute wound healing. **Clinics in Dermatology**, v. 25, n. 1, p. 9–18, fev. 2007.
- MACHADO, B. A. S. et al. Chemical Composition and Biological Activity of Extracts Obtained by Supercritical Extraction and Ethanolic Extraction of Brown, Green and Red Propolis Derived from Different Geographic Regions in Brazil. **PloS One**, v. 11, n. 1, p. e0145954, 2016.
- MAHDAVIAN DELAVARY, B. et al. Macrophages in skin injury and repair. **Immunobiology**, v. 216, n. 7, p. 753–762, jul. 2011.

MAIA DE ARAUJO, Y. F. **Estudo da atividade antimicrobiana de variedades de própolis da região da foz do Rio São Francisco-Brasil**. Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente)—Aracaju/SE: Universidade Tiradentes, jan. 2009.

MANACH, C. et al. Polyphenols: food sources and bioavailability. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, n. 5, p. 727–747, maio 2004.

MANN, J. (ED.). **Natural products: their chemistry and biological significance**. 1st ed ed. Harlow, Essex, England : New York: Longman Scientific & Technical ; Wiley, 1994.

MARCUCCI, M. C. et al. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 74, n. 2, p. 105–112, fev. 2001.

MARTIN, L. F. et al. Topical Brazilian propolis improves corneal wound healing and inflammation in rats following alkali burns. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, n. 1, p. 337, 2013.

MARTIN, P. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. **Science (New York, N.Y.)**, v. 276, n. 5309, p. 75–81, 4 abr. 1997.

MAURIN, C.; BAILLY, F.; COTELLE, P. Structure-activity relationships of HIV-1 integrase inhibitors--enzyme-ligand interactions. **Current Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 18, p. 1795–1810, set. 2003.

MELLO, M. H. S. H. DE; SILVA, E. A. DA; NATAL, D. Abelhas africanizadas em área metropolitana do Brasil: abrigos e influências climáticas. **Revista de Saúde Pública**, v. 37, n. 2, p. 237–241, abr. 2003.

MENEZES, H.; ALVAREZ, J. M.; ALMEIDA, E. Mouse ear edema modulation by different propolis ethanol extracts. **Arzneimittel-Forschung**, v. 49, n. 8, p. 705–707, ago. 1999.

MICHENER, C. D. The Brazilian bee problem. **Annual Review of Entomology**, v. 20, p. 399–416, 1975.

MIRZOEVA, O. K.; CALDER, P. C. The effect of propolis and its components on eicosanoid production during the inflammatory response. **Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids**, v. 55, n. 6, p. 441–449, dez. 1996.

MONTPIED, P. et al. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) prevents inflammatory stress in organotypic hippocampal slice cultures. **Brain Research. Molecular Brain Research**, v. 115, n. 2, p. 111–120, 23 jul. 2003.

NAGAI, T. et al. Preparation and antioxidant properties of water extract of propolis. **Food Chemistry**, v. 80, n. 1, p. 29–33, jan. 2003.

- NASCIMENTO, A. P.; COSTA, A. M. A. Overweight induced by high-fat diet delays rat cutaneous wound healing. **The British Journal of Nutrition**, v. 96, n. 6, p. 1069–1077, dez. 2006.
- NETO, F. L.; NETO, R. M. DE A. Principais mercados apícolas mundiais e a apicultura Brasileira. **Revista Mensagem Doce**, v. 84, n. 1, jul. 2005.
- NOLKEMPER, S. et al. Mechanism of herpes simplex virus type 2 suppression by propolis extracts. **Phytomedicine**, v. 17, n. 2, p. 132–138, fev. 2010.
- NUNES, L. C. C. et al. Variabilidade sazonal dos constituintes da própolis vermelha e bioatividade em *Artemia salina*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2b, jun. 2009.
- OLDONI, T. L. C. **Isolamento e identificação de compostos com atividade antioxidante de uma nova variedade de própolis brasileira produzida por abelhas da espécie *Apis mellifera***. Dissertação (Mestrado em ciências e Tecnologia de Alimentos)—Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba: Universidade de São Paulo, 2007.
- OLIVEIRA, M. L. DE; CUNHA, J. A. Abelhas africanizadas *Apis mellifera scutellata* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera: Apidae: Apinae) exploram recursos na floresta amazônica? **Acta Amazonica**, v. 35, n. 3, p. 389–394, set. 2005.
- O'NEILL, L. A.; KALTSCHMIDT, C. NF-kappa B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. **Trends in Neurosciences**, v. 20, n. 6, p. 252–258, jun. 1997.
- ORSATTI, C. L. et al. Th1/Th2 cytokines' expression and production by propolis-treated mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 129, n. 3, p. 314–318, 16 jun. 2010.
- OVALLE, W. K.; NAHIRNEY, P. C. **Neter bases da histologia**, Rio de Janeiro: Elsevier Ltda. 1 ed, 2008, cap 11.
- OZTÜRK, F. et al. The effect of propolis extract in experimental chemical corneal injury. **Ophthalmic Research**, v. 32, n. 1, p. 13–18, fev. 2000.
- PARK, Y. K. et al. Antimicrobial activity of propolis on oral microorganisms. **Current Microbiology**, v. 36, n. 1, p. 24–28, jan. 1998.
- PARK, Y. K. et al. Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. **Ciência Rural**, v. 32, n. 6, dez. 2002.
- PAVILONIS, A. et al. [Antimicrobial activity of soft and purified propolis extracts]. **Medicina (Kaunas, Lithuania)**, v. 44, n. 12, p. 977–983, 2008.
- PELEG, H.; BODINE, K. K.; NOBLE, A. C. The influence of acid on astringency of alum and phenolic compounds. **Chemical Senses**, v. 23, n. 3, p. 371–378, jun. 1998.

PEREIRA, A. DOS S.; SEIXAS, F. R. M. S.; NETO, F. R. DE A. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas e suas futuras. **Química Nova**, v. 25, n. 2, p. 321–326, 2002.

PERRI, A. Própolis vermelha combate células leucêmicas humanas. **Jornal UNICAMP**, n. 517, Dezembro 2011.

PROFYRIS, C.; TZIOTZIOS, C.; DO VALE, I. Cutaneous scarring: Pathophysiology, molecular mechanisms, and scar reduction therapeutics Part I. The molecular basis of scar formation. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 66, n. 1, p. 1–10; quiz 11–12, jan. 2012.

REINKE, J. M.; SORG, H. Wound repair and regeneration. **European Surgical Research. Europäische Chirurgische Forschung. Recherches Chirurgicales Européennes**, v. 49, n. 1, p. 35–43, 2012.

RIGHI, A. A.; NEGRI, G.; SALATINO, A. Comparative chemistry of propolis from eight brazilian localities. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM**, v. 2013, p. 267878, 2013.

RODRIGUES, C. R. F. et al. Mutagenic and genotoxic effects of *Baccharis dracunculifolia* (D.C.). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 124, n. 2, p. 321–324, 15 jul. 2009.

RODRÍGUEZ, S. et al. Effects of Cuban red propolis on galactosamine-induced hepatitis in rats. **Pharmacological Research**, v. 35, n. 1, p. 1–4, jan. 1997.

RUSSO, A.; LONGO, R.; VANELLA, A. Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. **Fitoterapia**, v. 73 Suppl 1, p. S21–29, nov. 2002.

SEBRAE. **Informações de Mercado sobre Mel e Derivados da Colméia: Relatório Completo**. Série Mercado. Brasília: [s.n.].

SFORCIN, J. M. Propolis and the immune system: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, n. 1, p. 1–14, 15 ago. 2007.

SILVA, B. B. et al. Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of brazilian propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM**, v. 5, n. 3, p. 313–316, set. 2008.

SILVA, J. C. et al. Antimicrobial activity, phenolic profile and role in the inflammation of propolis. **Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 50, n. 5, p. 1790–1795, maio 2012.

SIMÕES-AMBROSIO, L. M. C. et al. The role of seasonality on the inhibitory effect of Brazilian green propolis on the oxidative metabolism of neutrophils. **Fitoterapia**, v. 81, n. 8, p. 1102–1108, dez. 2010.

SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Florianópolis; Porto Alegre: Editora da UFSC Editora da UFRGS, 2007.

SINGER, A. J.; CLARK, R. A. Cutaneous wound healing. **The New England Journal of Medicine**, v. 341, n. 10, p. 738–746, 2 set. 1999.

SMITH, P. K. et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, v. 150, n. 1, p. 76–85, out. 1985.

SONG, Y. S. et al. Caffeic acid phenethyl ester inhibits nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity. **Cancer Letters**, v. 175, n. 1, p. 53–61, 10 jan. 2002.

SURH, Y. J. et al. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF-kappa B activation. **Mutation Research**, v. 480-481, p. 243–268, 1 set. 2001.

TEIXEIRA, M. A. C.; GODOY, M. G. DE; COELHO, C. (EDS.). **20 experiências de gestão pública e cidadania: ciclo de premiação 2004**. São Paulo: Programa Gestão Públ. e Cidadania [u.a.], 2004.

TELES, F. et al. Brazilian red propolis attenuates hypertension and renal damage in 5/6 renal ablation model. **PloS One**, v. 10, n. 1, p. e0116535, 2015.

THOMSON, W. M. Propolis. **The Medical Journal of Australia**, v. 153, n. 11-12, p. 654, 3 dez. 1990.

TOLEDO, V. D. A. A. DE et al. Ocorrência e coleta de colônias e de enxames de abelhas africanizadas na zona urbana de Maringá, Estado do Paraná, Brasil. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 28, n. 3, 10 jan. 2006.

TRUSHEVA, B.; TRUNKOVA, D.; BANKOVA, V. Different extraction methods of biologically active components from propolis: a preliminary study. **Chemistry Central Journal**, v. 1, p. 13, 2007.

VOLPI, N.; BERGONZINI, G. Analysis of flavonoids from propolis by on-line HPLC-electrospray mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 42, n. 3, p. 354–361, 26 set. 2006.

WILLIAMS, K. J. et al. ZD6474, a potent inhibitor of vascular endothelial growth factor signaling, combined with radiotherapy: schedule-dependent enhancement of antitumor activity. **Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research**, v. 10, n. 24, p. 8587–8593, 15 dez. 2004.

WITTE, M. B.; BARBUL, A. General principles of wound healing. **The Surgical Clinics of North America**, v. 77, n. 3, p. 509–528, jun. 1997.

WU, Z. et al. Brazilian green propolis suppresses the hypoxia-induced neuroinflammatory responses by inhibiting NF- κ B activation in microglia. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2013, p. 906726, 2013.

YORDI, E. et al. Antioxidant and Pro-Oxidant Effects of Polyphenolic Compounds and Structure-Activity Relationship Evidence. In: BOUAYED, J. (Ed.). . **Nutrition, Well-Being and Health**. [s.l.] InTech, 2012.

ANEXO A – Comitê de ética

	<p>UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO INSTITUTO DE BIOLOGIA ROBERTO ALCANTARA GOMES</p>	
<p><u>COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS</u></p>		
<p>CERTIFICADO</p>		
<p>Certificamos que o Protocolo nº CEUA/028/2014 sobre "Polifenóis da propólis: uma estratégia nutricional sobre o reparo tecidual cutâneo" sob a responsabilidade de Julio Beltrame Daleprane, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ (CEUA), em 29/05/2014. Este certificado expira em 29/05/2018.</p>		
<p>Rio de Janeiro, 29 de Maio de 2014.</p>		
<hr/> <p>Profa. Dra. Patrícia C. Lisboa CEUA/IBRAG/UERJ</p>	<hr/> <p>Profa. Dra. Elaine de Oliveira CEUA/IBRAG/UERJ</p>	
<hr/> <p>Prof. Dr. Israel Felzenszwalb CEUA/IBRAG/UERJ</p>	<hr/> <p>Dr. Sylvio Claudio Neto CEUA/IBRAG/UERJ</p>	