

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ESTRUTURAL E FUNCIONAL**

RAVEL CAVALCANTE MARINHO

**EFEITOS DA FOTOBIMODULAÇÃO ASSOCIADO AO PRÓPOLIS VERDE NA
ANGIOGÊNESE, PRODUÇÃO E REORGANIZAÇÃO DO COLÁGENO EM
FERIDAS CUTÂNEAS DE RATOS DIABÉTICOS.**

**NATAL-RN
2018**

RAVEL CAVALCANTE MARINHO

EFEITOS DA FOTOBIMODULAÇÃO ASSOCIADO AO PRÓPOLIS VERDE NA
ANGIOGÊNESE, PRODUÇÃO E REORGANIZAÇÃO DO COLÁGENO EM
FERIDAS CUTÂNEAS DE RATOS DIABÉTICOS.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Estrutural e Funcional da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Biologia Estrutural e Funcional.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Galvão Barboza.

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Naisandra Bezerra Da Silva Farias.

NATAL-RN
2018

AUTOR: Marinho, Ravel Cavalcante

TÍTULO: EFEITOS DA FOTOBIMODULAÇÃO ASSOCIADO AO PRÓPOLIS VERDE NA ANGIOGÊNESE, PRODUÇÃO E REORGANIZAÇÃO DO COLÁGENO EM FERIDAS CUTÂNEAS DE RATOS DIABÉTICOS.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Estrutural e Funcional da Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

DATA DA DEFESA: 21/12/2018

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Rodrigo Marcel Valentim da Silva
Faculdade Maurício de Nassau

Prof. Dr. Carlos Eduardo Bezerra de Moura
Universidade Federal Rural do Semiárido

Prof. Dr. Carlos Augusto Galvão Barboza
Universidade Federal do Rio Grande do Norte

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois a Fé nele nos faz ter essa força que transforma tempos adversos em novas oportunidades de crescimento;

Agradeço aos meus familiares: Robert Nicholas de Araújo Marinho (Pai), Euzenir Martins Cavalcante Marinho (Mãe), Paulo Raeli Cavalcante Marinho (Irmão) por todo o amor, e por sempre estarem ao meu lado em minhas decisões;

Ao meu orientador: Prof. Carlos Augusto Galvão Barboza e co-orientadora Naisandra Bezerra da Silva, por todo o apoio, generosidade, compaixão e entusiasmo na condução de todo o trabalho;

Aos professores Flávio Santos da Silva e Bento e João da Graça Azevedo Abreu pela contribuição técnica-científica e por sempre estarem disponíveis a ajudar.

Agradeço ao Departamento de Morfologia/UFRN e aos Programas de Pós-Graduação em Biologia Estrutural & Funcional e Patologia Oral pela disponibilização da infraestrutura necessária e aos profissionais destes programas pelo total suporte para concretização da pesquisa;

Um agradecimento especial aos funcionários de apoio técnico desses programas (Socorro, Melina e Rhudson; Hélio e Sandra) e aos funcionários de apoio do Departamento de Morfologia, Sra. Francisca e Sr. Edílson.

Ao laboratório Microcelt e Labneuro, nas pessoas da Prof^a Naiane Kelly Clebis e Prof. Expedito Silva do Nascimento Júnior pelo suporte na execução dos experimentos, e aos demais docentes do PPG-Biologia Estrutural e Funcional: Calos Eduardo Bezerra, Alianda da Silva, Danielle Morais, Fernando Ladd, Judney Cavalcante, Miriam Costa, Raimundo Araújo Júnior e Simone da Costa por todo o conhecimento transmitido;

Aos colegas da turma de Mestrado, em especial aos amigos Kaio Ramon, Eryck Holmes, Lucas Norberto

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Rio Grande do Norte pela concessão de bolsa no período inicial do Mestrado;

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Etapas de degranulação dos mastócitos em tecido cutâneo corado com Azul de Toluidina. **(A)** MCT1, **(B)** MCT2, **(C)** MCT3. **Fonte:** Produção do autor, seguindo os parâmetros preconizados por Bargheri, *et al.*, (2018).28

Figura 2. Aspecto macroscópico das feridas, com retração progressiva das lesões ao longo do experimento nos diferentes grupos estudados. **Legenda:** D: dia (intervalo experimental); N: normoglicêmico; C: diabético controle (não tratado); L: diabético tratado com laserterapia; P: diabético tratado com aplicação tópica de própolis; LP: diabético tratado com laserterapia associada a aplicação tópica de própolis.31

Figura 3. Curva obtida do coeficiente de contração das feridas nos grupos estudados ao longo do experimento. Observa-se um padrão crescente de contração da ferida nos grupos tratados, especialmente o grupo LP.32

Figura 4. Coeficiente de contração das feridas cutâneas nos grupos estudados ao longo do experimento. Os dados estão expressos em média \pm erro padrão da média. Letras representam diferença estatisticamente significativas em relação ao grupo C (controle diabético não tratado); b: $p < 0,01$; c: $p < 0,001$; d: $p < 0,0001$. # representa diferença significativa com os demais grupos tratados ($p < 0,05$). (Teste de Mann-Whitney).32

Figura 5. Fotomicrografias das feridas coradas com Picrosirius Red avaliadas por microscopia de luz polarizada (b) e fluorescência (f) ao longo dos tempos experimentais (A) (Aumento: 20x). Área total de colágeno das feridas cutâneas avaliadas sob luz polarizada e birrefringência das fibras nos grupos estudados ao longo do experimento (B). Área total de colágeno das feridas cutâneas avaliadas sob microscopia de fluorescência nos grupos estudados ao longo do experimento (C). Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão da média. * $p < 0,05$; # representa diferença significativa com os demais grupos tratados ($p < 0,05$). (ANOVA com pós teste de Tukey).....33

Figura 6 Porcentagem de fibras finas (A) e fibras espessas (B) de colágeno após separação das cores por birrefringência analisadas sob luz polarizada. Os dados

estão expressos em média \pm desvio padrão da média. * $p < 0,05$; # representa diferença significativa com os demais grupos tratados ($p < 0,05$). (ANOVA com pós teste de Tukey)34

Figura 7. Comparação entre os métodos de avaliação do colágeno por birrefringência e Fluorescência e gráfico de dispersão da correlação entre os métodos de quantificação do colágeno no tecido sadio, adjacente à lesão (A) e no leito da ferida (B). * $p < 0,05$; Teste-t pareado e Correlação de Spearman (A-B); Teste de Wilcoxon e Correlação de Pearson (C-D).....34

Figura 8. Índice de orientação das fibras de colágeno, obtido por análise no Image J através do plugin *fast Fourier transform*. Valores próximo a 0 indicam uma organização mais paralela das fibras, enquanto valores mais próximos a 1, indicam uma maior aleatoriedade. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão da média. * $p < 0,05$; # representa diferença significativa com os demais grupos tratados ($p < 0,05$). (ANOVA com pós teste de Tukey)35

Figura 9. Fotomicrografias das feridas coradas com Azul de Toluidina, evidenciando a presença de mastócitos nos diferentes grupos ao longo do experimento (A) (Aumento: 40x). Os gráficos representam a média \pm desvio padrão do número de MCT1 (B), MCT2 (C), MCT3 (D) e total de Mastócitos (E), comparados por ANOVA com pós teste de Tukey. * $p < 0,05$; # representa diferença significativa com os demais grupos tratados ($p < 0,05$).37

Figura 10. Expressão imunoistoquímica de α -SMA dos grupos N, C, L, P e LP (A–E, respectivamente) ao 14^o dia de experimento (Aumento: 40x). O gráfico (F), representa a média \pm desvio padrão do total de miofibroblastos nos grupos ao longo do experimento, comparados por teste de Kruskal Wallis e comparados individualmente com teste de Mann-Whitney; * $p < 0,05$38

Figura 11. Expressão imunoistoquímica de CD105 dos grupos N, C, L, P e LP (A–E, respectivamente) ao 14^o dia de experimento (Aumento: 40x). O gráfico (F) representa a média \pm desvio padrão do total de vasos neoformados nos grupos ao longo do experimento, comparados por teste de Kruskal Wallis e comparados individualmente com teste de Mann-Whitney; * $p < 0,05$38

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIações

α	Alfa
β	Beta
μm	Micrômetro
AGEs	Produtos Finais de Glicação Avançada (do inglês <i>Advanced glycation end products</i>)
AlGaInP	Alumínio-Gálio-Índio-Fósforo
CD105	Endoglina
cm	Centímetro
DM	Diabetes Mellitus
DM1	Diabetes Mellitus Tipo 1
DM2	Diabetes Mellitus Tipo 2
FGF	Fator de Crescimento de Fibroblastos (do inglês <i>Fibroblast Growth Factor</i>)
J	Joule
LBI	Laser de Baixa Intensidade
MCT1	Mastócitos Tipo 1
MCT2	Mastócitos Tipo 2
MCT3	Mastócitos Tipo 3
nm	Nanômetro
PDGF	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (do inglês <i>Platelet-Derived Growth Factor</i>)
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio (do inglês <i>Reactive Oxygen Species</i>)
SMA	Actina de Músculo Liso (do inglês <i>Smooth Muscle Actin</i>)
TGF	Fator de Crescimento Transformante (do inglês <i>Transforming Growth Factor</i>)
TNF	Fator de Necrose Tumoral (do inglês <i>Tumor Necrosis Factor</i>)
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular (do inglês <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>)

RESUMO

No diabetes mellitus (DM) o acúmulo de produtos finais de glicação avançada promove alterações estruturais e bioquímicas nos tecidos, interferindo no retardo do reparo de feridas cutâneas para o surgimento de complicações clínicas, especialmente o retardo no reparo de feridas cutâneas. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da combinação de laserterapia e aplicação tópica de extrato de própolis verde na cicatrização de feridas cutâneas em ratos com DM induzida por estreptozotocina. Ratos machos Wistar (n=90) foram alocados em cinco grupos experimentais de acordo com a indução ou não da DM e da terapêutica empregada nas feridas cutâneas produzidas cirurgicamente: (N) normoglicêmico sem terapia; (C) controle diabético sem terapia; (L) laserterapia (660 nm, 30 mW, 4 J/cm²); (P) administração tópica de própolis verde (extrato alcoólico a 30%); e (LP) terapia combinada de laser e própolis. As aplicações das terapêuticas foram realizadas no momento pós-cirúrgico imediato e diariamente por seis dias. Nos intervalos de 7, 14 e 21 dias, o fechamento da ferida foi avaliado através de imagens digitais da área cirúrgica dos animais, submetidos posteriormente à eutanásia. Cortes histológicos da área de cicatrização foram corados com *Picrosirius red* para análise quantitativa da área ocupada e do padrão de organização do colágeno sob microscopia de luz polarizada e fluorescência; e com Azul de Toluidina para contagem de mastócitos intactos e em degranulação. A densidade vascular e número de miofibroblastos foram avaliados pela expressão imunoistoquímica de CD105 e α -actina de músculo liso (α -SMA), respectivamente. Os dados demonstram que os grupos tratados (L, P e LP) exibiram uma contração acelerada da ferida cirúrgica ($p < 0,05$) e um índice de colagenização mais elevado ($p < 0,05$), tanto por microscopia de luz polarizada quanto por fluorescência. Estes dois métodos de avaliação apresentaram um índice de correlação forte no tecido sadio ($r = 0,7559$; $p < 0,0001$), e moderado no leito da ferida ($r = 0,5446$; $p < 0,0001$). Os grupos tratados exibiram uma organização morfológica mais aleatória ($p < 0,05$) pelo índice de orientação do colágeno e uma substituição progressiva das fibras finas por fibras espessa de colágeno. Um maior número de miofibroblastos foi evidenciado nas feridas tratadas com P, LP e L, nos dias 7, 14 e 21, respectivamente. Observou-se uma quantidade menor de mastócitos em degranulação nos grupos tratados ($p < 0,05$), com uma redução ainda maior no grupo LP. A densidade vascular permaneceu mais elevada nos grupos tratados, com melhor índice de neovascularização nos grupos P nos dias 7 e 21, e LP no 14º dia. Concluiu-se que a associação de laser e própolis promove um reparo mais rápido de feridas em ratos diabéticos por menor degranulação de mastócitos, aumento na densidade vascular, além de maior produção e organização do colágeno, com maior densidade de miofibroblastos.

Palavras-chave: Laserterapia; Reparo tecidual; Mastócitos; Endogлина; Miofibroblastos.

ABSTRACT

In diabetes mellitus (DM) the accumulation of advanced glycation end products promotes structural and biochemical changes in the tissues, contributing to the development of clinical complications, especially delayed skin wound repair. The aim of this study was to evaluate the effect of the combination of laser therapy and topical application of green propolis extract on cutaneous wound healing in rats with DM induced by streptozotocin. Male Wistar rats (n = 90) were divided into five groups according to whether or not the DM Induction and the therapy employed in surgically produced cutaneous wounds: (N) normoglycemic without therapy; (C) diabetic control without therapy; (L) laser therapy (660 nm, 30 mW, 4 J/cm²); (P) topical administration of green propolis (30% alcohol extract); and (LP) combined laser and propolis therapy. The treatments were performed at the immediate postoperative moment and daily for six days. At intervals of 7, 14 and 21 days, wound closure was assessed by digital image of the surgical site and the animals were then submitted to euthanasia. Histological sections of the healing area were stained with Picrosirius Red for quantitative analysis of the occupied area and the organization pattern of the collagen under polarized light microscopy and fluorescence; and with Toluidine Blue for counting of intact and degranulating mast cell. The microvessel density and the number of myofibroblasts were evaluated by immunohistochemical expression of CD105 and α -smooth muscle actin (α -SMA), respectively. Data show that the treated groups (L, P and LP) exhibited an accelerated contraction of the surgical wound ($p < 0.05$) and a higher collagenation index, both in polarized and fluorescence light microscopy ($p < 0.05$). These two methods of evaluation had a strong correlation index in healthy tissue ($r = 0.7559$; $p < 0.0001$), and moderate in the wound bed ($r = 0.5446$; $p < 0.0001$). The treated groups showed a more random morphological organization ($p < 0.05$) by collagen orientation index and a progressive replacement of fine fibers by a thick collagen fibers. A higher number of myofibroblasts was evident in the wounds treated with P, LP and L, on days 7, 14 and 21, respectively. A smaller amount of degranulating mast cells was observed in the treated groups ($p < 0.05$), with an even greater reduction in LP group. The vascular microdensity remained higher in the treated groups, with a better neovascularization index in the P groups on days 7 and 21, and in LP on day 14. It is concluded that the association of laser and propolis promotes a faster repair of wounds in diabetic rats by lower degranulation of mast cells, increase in vascular density, and greater production and organization of collagen through the higher density of myofibroblasts.

Keywords: Laser therapy; Tissue repair; Mast cells; Endoglin; Myofibroblasts.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E REFERENCIAL TEÓRICO	9
1.1 – Cicatrização de feridas cutâneas	9
1.2 – Influência do Diabetes mellitus (DM) no reparo tecidual	13
1.3 – Terapia com laser de baixa intensidade na cicatrização	15
1.4 – Uso da Própolis na cicatrização	18
2. JUSTIFICATIVA.....	21
3. OBJETIVOS.....	22
3.1 – Objetivo Geral	22
3.2 – Objetivos Específicos.....	22
4. MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1 – Princípios Éticos.....	23
4.2 – Delineamento do estudo, população e amostra	23
4.3 – Grupos experimentais	23
4.4 – Indução do Diabetes	24
4.5 – Avaliação da Glicemia.....	24
4.6 – Produção das feridas cutâneas.....	24
4.7 – Laserterapia	25
4.8 – Administração da Própolis.....	25
4.9 – Avaliação macroscópica do fechamento da ferida	26
4.10 – Obtenção e processamento análise dos espécimes teciduais	26
4.11 – Análise do conteúdo e orientação das fibras de colágeno	26
4.12 Quantificação de mastócitos totais e em degranulação	28
4.13 Expressão imunohistoquímica (α -SMA e CD105).....	29
4.14 – Análise Estatística	30
5. RESULTADOS.....	31
5.1 Fechamento da Ferida	31
5.2 Conteúdo e Organização das Fibras de Colágeno	32
5.3 Mastócitos.....	35
5.5 Miofibroblastos	36
5.6 Densidade Vascular	36
6. DISCUSSÃO	39
7. CONCLUSÃO	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

1. INTRODUÇÃO E REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 – Cicatrização de feridas cutâneas

Uma ferida na pele é caracterizada pela interrupção da continuidade do tecido cutâneo, podendo ser causada por qualquer tipo de trauma físico, químico, mecânico ou desencadeada por uma afecção clínica, que aciona então as respostas de defesa orgânica (CHAVES *et al.*, 2014).

Uma vez formada a lesão, a pele possui dois mecanismos para reparação tissular: a regeneração e a cicatrização. Na regeneração ocorre substituição do tecido lesionado por um novo tecido semelhante ao pré-existente, através de um processo inflamatório agudo que aproxima as bordas epiteliais em direção ao centro da ferida, ocluindo rapidamente sua superfície, permanecendo íntegra a camada basal do epitélio (GURTNER *et al.*, 2008). A cicatrização, por sua vez, ocorre quando há um dano mais profundo às camadas da pele e há impossibilidade de regeneração das estruturas epiteliais; por conseguinte, a cicatrização ocorre com deposição de colágeno, compondo um arranjo que difere do original nesse novo tecido (HUSSNI, *et al.*, 2010).

Dependendo da área de extensão da lesão, a cicatrização poderá ser classificada em dois tipos básicos: por primeira intenção, quando a perda tecidual não impede que as bordas da lesão sejam aproximadas mecanicamente, havendo perda mínima de tecido; ou ainda por segunda intenção, quando a perda tecidual é intensa a ponto de impossibilitar que as bordas lesionadas se aproximem mecanicamente, havendo grande perda tecidual e fechamento das feridas por meio de contração (TAZIMA *et al.*, 2008). Recentemente mais classificações também têm sido adotadas, como cicatrização por terceira intenção, que acontece quando a ferida é mantida aberta para uma cicatrização por segunda intenção até substituição do tecido perdido através de enxertos (CARDOSO *et al.*, 2013).

A cicatrização de feridas consiste em uma cascata coordenada de eventos celulares e moleculares que interagem para que ocorra a reconstituição do tecido, dividida em três fases ou períodos sobrepostos: fase inflamatória, fase proliferativa e fase de remodelagem ou maturação (KILÍK *et al.*, 2014). Cada fase é caracterizada pela presença de infiltrados de células em locais específicos, ocorrendo de forma integrada, e coordenada por mediadores químicos, no sentido de aprimorar o reparo

(TRESVENZOL *et al.*, 2013). Embora exista uma divisão entre as fases, essas acontecem de forma sobrepostas, formando interfases de transição que podem determinar se o reparo de uma ferida acontece adequadamente (CHILDS, MURTHY, 2016).

A fase inflamatória é iniciada com lesão dos capilares, desencadeando a formação de um coágulo sanguíneo constituído por fibrina e fibronectina. Estes formam uma matriz provisória, preenchendo a área da lesão e permitindo que várias células sejam recrutadas e migrem o local. As plaquetas presentes no coágulo sanguíneo liberam múltiplas quimiocinas que participam do recrutamento de células inflamatórias, neutrófilos e macrófagos, mas também atuam na quimiotaxia de fibroblastos e células endoteliais (DARBY *et al.*, 2014).

Os mastócitos desempenham um papel importante na inflamação, resposta imune e reparo tecidual devido aos potentes mediadores armazenados em grânulos, relacionados à proliferação de fibroblastos e à síntese de colágeno. Entre esses mediadores estão a histamina, heparina, ácido hialurônico, proteoglicanos, proteases, fatores de crescimento e citocinas (DE CASTRO *et al.*, 2014).

Os mastócitos estão intimamente envolvidos no processo de inflamação aguda, liberando mediadores inflamatórios. Os fatores essenciais deste evento - vasodilatação e recrutamento e aumento da sobrevivência dos leucócitos - são produzidos e liberados pelos mastócitos. Embora a inflamação seja vital para o aprimoramento da etapa proliferativa, a inflamação extrema dificulta a reparação da lesão da pele (Guo e Di Pietro, 2010). A infiltração e a proliferação dos mastócitos são necessárias para a secreção de certas moléculas envolvidas na cicatrização de feridas, especialmente na liberação de mediadores inflamatórios como a histamina e o Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α) (McLaughlin e Szagon, 2014), citocina que exerce uma influência negativa no reparo de lesões cutâneas (Bagheri, *et al.*, 2018).

Os mastócitos interagem com macrófagos, células endoteliais e fibroblastos, e há evidências que suportam sua participação na cicatrização de feridas, modulando a fase inflamatória pelo recrutamento de neutrófilos para o local da lesão, além de secretarem citocinas que ativam os macrófagos residentes no tecido (YOUNAN *et al.*, 2010).

Durante a fase proliferativa, os mastócitos estimulam a proliferação de fibroblastos via interleucina-4, fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fator de crescimento básico de fibroblastos (FGF) e promovem granulação do tecido da

ferida, migração celular, angiogênese e maturação de colágeno (TELLECHEA *et al.*, 2016).

A vasculatura é um dos componentes cruciais para o processo de cicatrização de feridas, contribuindo para a hemostasia inicial, reduzindo a perda de sangue pela vasoconstrição, além de estabelecer uma matriz provisória da ferida. A liberação de citocinas e fatores de crescimento derivados do coágulo sanguíneo conduzem para o recrutamento de células essenciais para o processo de reparo, criando um microambiente provisório para a regeneração tecidual, representando um ponto de partida para formação e regeneração de novos vasos, fomentando a neoangiogênese que virá fornecer oxigênio, perfusão nutritiva e distribuição de células imunitárias indispensáveis para a resolução e cura da ferida (SORG *et. al.*, 2017).

A angiogênese começa nos primeiros 1 a 2 dias após a lesão vascular e pode tornar-se evidente em cerca de 4 dias após a lesão, ocorrendo a migração de células endoteliais de vênulas intactas para a borda da ferida, formando novos capilares. Sabe-se que ambiente metabólico da ferida induz a liberação dinâmica de famílias de fatores de crescimento como o Fator de Necrose Tumoral (TNF), Fator de Crescimento Transformante (TGF), Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF), Fator de Crescimento de Fibroblastos (FGF) e Fator de Crescimento derivado de Plaquetas (PDGF), derivados de macrófagos, plaquetas e células endoteliais danificadas, que são cruciais para o processo de reparo, principalmente durante a angiogênese (RAJA, GARCIA e ISSEROFF, 2007).

Perturbações no processo de angiogênese desencadeiam defeitos de cicatrização de feridas ou transformações em úlceras crônicas, tipicamente observadas na insuficiência venosa, na doença arteriosclerótica, e, em especial, nas feridas crônicas de diabéticos. A angiogênese insuficiente desempenha um papel significativo na patogênese da cicatrização de feridas diabéticas, em decorrência dos seus efeitos micro e macrovascular, evidenciando uma diminuição da vascularização e da densidade capilar (DINH e VEVES, 2005).

Ultimamente, vários marcadores de angiogênese foram estabelecidos, com afinidade por células endoteliais tais como CD34, CD31, endogлина (CD105), VEGF e seus receptores vWF e VEGFR3. Estes marcadores são utilizados para acompanhar a transição de estágios indiferenciados iniciais para células maduras, mas também para avaliar sua identificação e discriminação de outras linhagens celulares (RAKOCEVIK *et al.*, 2011).

Na pele normal e na cicatriz madura os níveis de colágeno imaturo tipo III são 20% maiores em relação ao colágeno maduro tipo I, podendo atingir uma diferença de 50% durante a fase proliferativa (XUE, JACKSON, 2015). Ainda durante essa fase, ocorre o aumento da proliferação de fibroblastos; biossíntese de colágeno, que cria uma rede extracelular tridimensional de tecido conjuntivo; e a produção de fatores quimiotáticos e interferon por fibroblastos, que são os mecanismos responsáveis pela formação do tecido de granulação, nomeado dessa forma por sua aparência granular (GONZALES *et al.*, 2016).

O tecido de granulação é um dos principais responsáveis pelo fechamento da ferida através de uma contração ativa, sendo o miofibroblasto a célula responsável por esse fenômeno. Essas células são produzidas durante a fase proliferativa por fibroblastos localizados nas bordas das feridas que adquirem um fenótipo miofibroblástico, entretanto os fibroblastos recrutados para o centro da lesão são as principais fontes de miofibroblastos (DRISKELL *et al.*, 2013), cujo aparecimento é antecedido pelo protomiofibroblasto, que possui fibras de estresse contendo β e γ -actinas citoplasmáticas e geralmente evoluem para miofibroblastos diferenciados, passando a expressar α -Actina de Músculo Liso (α -SMA) em suas fibras de estresse. Essa característica garante aos miofibroblastos diferenciadas capacidades contráteis importantes para a maturação do tecido de granulação e das bordas da ferida (DARBY *et al.*, 2014). Um dos principais desafios para o gerenciamento eficaz de feridas é entender como a formação controlada, a persistência e o desaparecimento dos miofibroblastos se desequilibram no reparo de feridas patológicas (DARBY *et al.*, 2016)

A maturação/remodelação é a fase final da cicatrização de feridas e pode durar de 3 semanas a 2 anos pós-lesão. Na cicatriz, os fibroblastos começam a diminuir à medida que o colágeno é depositado, tentando garantir a homeostasia do tecido recém-formado, que é predominantemente composta de colágeno tipo I e III com as fibras de colágeno recém-formadas desorganizadas e dispostas aleatoriamente. À medida que a cicatrização da ferida avança, o colágeno tipo III é gradualmente substituído por colágeno tipo I e as fibras de colágeno são rearranjadas em uma estrutura mais organizada, aumentando a resistência mecânica do tecido (PARK; HWANG; YOON, 2017).

Feridas crônicas e cicatrizes hipertróficas são as principais complicações no reparo de feridas, que é considerada crônica quando ocorre lentamente num período

superior a 12 semanas com desorganização temporal e espacial de uma ou mais fases da cicatrização normal. Uma série de fatores fisiopatológicos podem causar a falha na cicatrização normal de feridas, incluindo inflamação, infecção, desnutrição, idade, insuficiência renal e diabetes mellitus (HASHEMI, MADANI, ABEDIANKENARI, 2015).

1.2 – Influência do Diabetes mellitus (DM) no reparo tecidual

De acordo com as estimativas do último Relato Global sobre Diabetes, publicado em 2016 pela Organização Mundial de Saúde, cerca de 422 milhões de adultos viviam com DM em 2014, representando uma prevalência de 8,5% da população adulta. Os dados mostram ainda que a doença causou aproximadamente 1,5 milhões de mortes em 2012, sendo a 8ª causa de morte em todo o mundo (WHO, 2016).

O DM abrange distúrbios metabólicos que compartilham o fenótipo da hiperglicemia (aumento expressivo da concentração de glicose sanguínea), como consequência da redução na secreção de insulina, diminuição da utilização da glicose e aumento da produção de glicose (KASPER *et al.*, 2017). Existem diversas formas de DM, no entanto os dois tipos mais comuns de DM são o tipo 1 (DM1) e tipo 2 (DM2). A DM1 é desencadeada por uma destruição autoimune de células β pancreáticas produtoras de insulina, ocorrendo na maioria dos casos em crianças e adultos jovens, e a DM2 é causada pela combinação da resistência à insulina junto da falta de compensação ao aumento da liberação de insulina adequada pelas células β (AL-AWAR *et al.*, 2016).

Sabe-se que o desenvolvimento do DM e suas complicações são acompanhados por aumento do estresse oxidativo e resposta inflamatória. As sérias complicações do DM, induz modificações fisiológicas nos tecidos e células, prejudicando o processo normal de cicatrização de feridas. A cicatrização de feridas diabéticas normalmente se torna retardada na fase inflamatória, caracterizada pelo influxo contínuo de neutrófilos, que liberam enzimas citotóxicas, várias espécies reativas de oxigênio (ROS) e mediadores inflamatórios, que causam danos colaterais extensivos ao tecido adjacente a ferida. Além disso, a superprodução de ROS nos tecidos da ferida induz o estresse oxidativo, resultando em efeitos citotóxicos prejudiciais, contribuindo para uma cicatrização tardia da ferida. O aumento do estresse oxidativo é uma das complicações mais comuns para a cicatrização prolongadas de feridas em pessoas com DM (ZHANG, *et al.*, 2015).

A glicação de proteínas, lipídios e ácidos nucleicos pelo aumento dos níveis de glicose leva à formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs). Os AGEs podem desempenhar efeitos sobre diversas células envolvidas no reparo cutâneo, como diminuir a viabilidade e migração de queratinócitos, reduzir a capacidade de proliferação dos fibroblastos dérmicos e tornar o colágeno resistente à proteólise por metaloproteases. Isso dificulta sua degradação e substituição por novas fibras funcionais, causa perda de flexibilidade e rigidez, além de resultar em distúrbios na rede de fibras elásticas e na microvasculatura por afetarem a elastina e a fibronectina (MAKRANTONAKI *et al.*, 2016).

A inflamação crônica na pele ou uma resolução inadequada da inflamação em feridas diabéticas prejudica o processo de cicatrização. Segundo Tellechea, *et al.*, (2016), a degranulação de mastócitos é aumentada na pele de humanos e camundongos com diabetes, o que torna a cicatrização de feridas prejudicada, portanto, agentes que previnem a degranulação dos mastócitos podem ter o potencial de melhorar a cicatrização de feridas no diabetes.

Há pouca informação sobre o número e o estado de ativação dos mastócitos da pele associado ao diabetes. Os mastócitos estão localizados ao redor de vasos sanguíneos e adipócitos, onde influenciam a inflamação local e a liberação de adipocitocinas. Além disso, os mastócitos afetam os macrófagos e contribuem para a obesidade e o diabetes induzidos por dieta (THEOHARIDES *et al.*, 2011). O fenótipo dos macrófagos pode ser amplamente caracterizado como "pró-inflamatório" M1 ou "imunomodulador/regenerativo" M2. A ativação do M1 é necessária durante a fase inflamatória aguda, mas também está presente em feridas crônicas caracterizadas por inflamação persistente (SINDRILAU *et al.*, 2011), enquanto a ativação do M2 durante a fase proliferativa promove a angiogênese e a produção de colágeno (NOVAK; KOH *et al.*, 2013).

A influência do diabetes em componentes celulares essenciais para o reparo tecidual, como no déficit de macrófagos e fenótipos alterados, está ligada à diminuição na angiogênese da ferida, uma vez que macrófagos são uma fonte importante de VEGF e outros mediadores pró-angiogênicos (OKONKWO e DIPIETRO, 2017). Estudos envolvendo a investigação de mecanismos da angiogênese em feridas cutâneas diabéticas mostraram a redução do mRNA e proteína do VEGF-A em camundongos diabéticos, e que a administração de VEGF-A induzia um fechamento

de ferida acelerado em comparação com camundongos não tratados (SEITZ et. al., 2010; GALIANO et. al., 2004; MIRZA e KOH, 2011).

No DM, as ulcerações cutâneas crônicas são comuns nas extremidades inferiores, particularmente no pé. As úlceras do pé diabético afetam 15% dos pacientes diabéticos e desses, 14–24% evoluem para necessidade de amputação do membro inferior com taxa mortalidade aproximada de 50–59% cinco anos após amputação (ALAVI et al., 2014). O fenótipo não cicatrizante das úlceras do pé diabético tem sido estabelecido por invasão microbiana, quebra epitelial e função imunológica comprometida (NOOR et al., 2015), além do baixo fluxo vascular como fator subjacente, evento que impede a cicatrização adequada das feridas, sendo, portanto, o suprimento vascular adequado e a proliferação de vasos importantes para o reparo tecidual na cicatrização de feridas diabéticas (PROMPERS et al., 2008).

1.3 – Terapia com laser de baixa intensidade na cicatrização

Os primeiros relatos de utilização da luz como modalidade terapêutica, datam do final século XVIII com a exposição de luz azul ou vermelha para o tratamento de doenças humanas como a tuberculose. Com o avanço tecnológico, novas formas de tratamento e emissão de luz foram desenvolvidas, e a partir dos anos 60 a possibilidade de estimular processos biológicos com a radiação laser foram demonstrados (ANDERS; LANZAFAME; ARANY, 2015).

Nos anos 70, o laser de baixa intensidade foi introduzido como modalidade terapêutica por Mester, que observou uma melhora na cicatrização de feridas com aplicação de uma energia baixa (1 J/cm^2) de laser de rubi (KILIK et. al., 2014). Desse período em diante, diferentes nomenclaturas foram utilizadas para a irradiação com laser terapeuticamente, tais quais Terapia com Laser de Baixa Intensidade (Low-Level Laser Therapy), “Laserterapia” (Laser Therapy), e recentemente a LED terapia (LED therapy). Visando uma padronização na classificação dessas terapias, o termo Fotobiomodulação tem sido proposto para descrever o uso dessas estratégias como agentes terapêuticos. (ANDERS; LANZAFAME; ARANY, 2015).

Atualmente observa-se um vasto número de pesquisas voltadas para o conhecimento e melhoras no processo de reparo tecidual, se destacando dentre elas as pesquisas utilizando fotobiomodulação e seus efeitos terapêuticos sobre diferentes eventos biológicos como a cicatrização, que pode ser mais eficaz e mais rápida

quando tratada com laser, e possivelmente associado à outras terapêuticas (KUFFLER, 2016).

O termo laser originou-se da abreviação de Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation (amplificação da luz por emissão estimulada de radiação), cuja teoria é do físico Albert Einstein. Este pesquisador expôs os princípios físicos da emissão estimulada chamado de “fenômeno laser”, sendo este classificado como de alta e baixa potência mediante a presença ou não de potencial destrutivo do laser (ROCHA JÚNIOR *et al.*, 2006).

A laserterapia refere-se ao uso do Laser de Baixa Intensidade (LBI) em dois diferentes espectros que são que variam de acordo com o comprimento de onda emitido. O espectro de ação vermelho ou visível está presente entre os comprimentos de onda de 630 a 680 nm, enquanto o infravermelho ou invisível compreende a emissão de comprimentos de onda próximo de 700 à 904 nm (BENSADOUIN; NAIR, 2015).

Muitos benefícios incluindo a estimulação ou inibição de atividades fisiológicas, bioquímicas ou proliferativas, estão associados à laserterapia, mais especificamente a biomodulação promovida por sua aplicação. Os efeitos são dependentes dos demais parâmetros selecionados como a potência, dose e tempo de emissão, havendo um limite de exposição que determina o alcance de efeitos benéficos ou não. Altas energias acima de limites específicos para diferentes tipos de tecidos podem ser prejudiciais (CHUNG *et al.*, 2012).

Em uma revisão, HUANG *et al.*, (2011) afirmaram que o mecanismo de ação do laser de baixa intensidade é regido por duas leis. A primeira diz respeito à absorção da luz, que deve acontecer por fotorreceptores existentes nas células, tais componentes presentes, por exemplo, na hemoglobina e nas mitocôndrias. A segunda lei está relacionada com a penetração da luz em um adequado comprimento de onda, que propicie a penetração da luz nos tecidos. Nos humanos isso acontece em um intervalo entre 650nm e 1200nm de comprimento de onda.

Corroborando com os achados de HUANG, *et al* (2011), a laserterapia aumenta os níveis de ATP celular, aumentando a disponibilidade de elétrons para a redução do oxigênio molecular no centro catalítico da Citocromo c Oxidase, suprime algumas citocinas inflamatórias tais como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8. Assim como regula positivamente fatores de crescimento tais como PDGF, IGF-1, NGF e FGF-2. (FREITAS; HAMBLIN, 2016)

A descrição de uma grande variedade de lasers pode ser encontrada na literatura, relatados como promotores do processo de cicatrização tecidual. Dentre os mais frequentemente utilizados estão: Hélio-Cádmio, Argônio, Hélio-Neônio, Krypton, Arseneto de Gálio e Alumínio e CO₂. Sabe-se, no entanto, que o sucesso da terapia de baixa potência e seus respectivos efeitos mostra-se dependente do comprimento de onda, potência, dose e tempo aplicados (ANDRADE *et al.*, 2014).

Nos últimos anos, vários estudos têm mostrado os benefícios do uso da laserterapia, tais como o tratamento das lesões dos tecidos moles, doenças articulares, feridas abertas, úlceras de pressão, entre outros. O laser de Alumínio-Gálio-Índio-Fósforo (AlGaInP; 660 nm) se apresenta como um agente terapêutico cuja irradiação nos tecidos lesionados desencadeia uma série de efeitos fisiológicos necessários para o processo de cicatrização de feridas por meio da fotobiomodulação, além de proporcionar outros efeitos terapêuticos, tais como: analgesias locais, redução de edema e aceleração da fase inflamatória (DA SILVA *et al.*, 2010).

Com a vantagem de ser não-invasiva, a abrangência das aplicações de laserterapia é ampla, passando de alívio da dor, lesões nervosas, osteoartrite e cicatrização de feridas (DE FREITAS e HAMBLIN, 2016), se apresentando cada vez mais como alternativa terapêutica no tratamento de lesões dérmicas como feridas e úlceras, condições pós-cirúrgicas, contusões musculares, artrite crônica, situações de isquemia, dor crônica, entre outras (LINS *et al.*, 2010).

Tem sido bem documentado que os lasers vermelhos podem reduzir a dor e a inflamação, aumentar a deposição de colágeno e acelerar o fechamento de feridas durante a cicatrização. A maioria das experiências com animais enfatizam que a laserterapia de baixa intensidade acelera a cicatrização de feridas mediante a melhoria da proliferação celular e formação de tecido de granulação, além do estímulo à síntese de colágeno, promovendo a formação de pró-colágeno tipo I e III (OCON *et al.*, 2019).

Dependendo do comprimento de onda utilizado, efeitos diferentes podem ser obtidos com a aplicação da laserterapia. Em estudo realizado por de Sousa, *et al.*, (2012) foi demonstrado que a utilização do laser com comprimento de onda de 904nm em 3J/cm² promoveu uma inibição bacteriana de 80% em estudo *in vitro*. Rathnakar *et al.*, (2016) evidenciou que os lasers de baixa potência no comprimento de onda aproximado entre 630 a 830nm têm demonstrado efeitos benéficos na cicatrização de feridas, sendo o comprimento de onda de 830nm o que apresentou melhor resposta

dentre os demais comprimentos de onda utilizados. Além disso, o tratamento proporcionou maior proliferação, neovascularização, deposição de colágeno, e reepitelização mais rápida em comparação com os controles não tratados.

A aplicação da laserterapia em dias alternados com 670nm, 9mW e 1J/cm² em quatro pontos tratados resultou no surgimento de miofibroblastos próximos aos vasos sanguíneos identificados no 3^o, 7^o e 10^o dias, além de ter ocasionado a síntese de fibras colágenas mais espessas com uma tendência a substituição rápida (colágeno III para I) no décimo, 15^o e 20^o dias, embora ao 30^o os resultados dos grupos tenham sido semelhantes (MEDRADO *et al.*, 2008).

Em estudo conduzido por de Loura Santana et al (2015), a laserterapia se mostrou mais eficaz quando aplicada no período pós-operatório por uma melhor organização do colágeno e aumento no número de miofibroblastos. Apesar de apresentar resultados similares para dose única de 4 J/cm² e em aplicações fracionadas de 1 J/cm², foi evidente que a aplicação no período inflamatório foi um fator importante para o aprimoramento do processo de reparo tecidual.

1.4 – Uso da Própolis na cicatrização

A própolis tem uma longa história na medicina popular, sendo empregada desde pelo menos o ano 300 a.C.; no entanto, ao longo da última década a descoberta da sua participação em diversas atividades farmacológicas e identificação de mais de 300 componentes em sua composição a tornaram um agente promotor da saúde, que tem sido utilizada popularmente em bebidas e alimentos com o objetivo de prevenir cardiopatias e doenças crônicas degenerativas como o DM (MADRIGAL-SANTILLÁN *et al.*, 2014).

A própolis é um material resinoso e lipofílico que as abelhas (*Apis mellifera L.*) coletam a partir das flores e usam na construção e adaptação de suas colmeias ou outras cavidades que habitam. É usada como uma fina camada para bloquear buracos e rachaduras, servindo de isolante térmico para mumificar carcaças de criaturas que foram mortas pelas abelhas após uma invasão da colmeia, se beneficiando também das suas atividades biológicas por funcionar como antimicrobiano que mantém a colmeia com baixas concentrações de bactérias e fungos (DE GROOT, 2013).

Em geral, a própolis *in natura* é composta por 30% de cera, 50% de resina e bálsamo vegetal, 10% de óleos essenciais e aromáticos, 5% de pólen e outras substâncias que vêm sendo descobertas ao longo dos anos, mas sua composição

química é tida como complexa e de difícil padronização, pois as substâncias variam de acordo com sua origem geográfica e com as diferenças genéticas das abelhas responsáveis por sua produção. Estas variações acarretam mudanças em suas propriedades farmacológicas, que tendem a ser maiores em regiões tropicais devido à riqueza vegetal existente. (SFORCIN, 2016).

Os grupos químicos de compostos identificados na própolis incluem flavonóides, ácidos fenólicos, ésteres, dirtepenos, sesquiterpenos, lignanas, aldeídos aromáticos, álcoois, aminoácidos, ácidos graxos, vitaminas e minerais, o que ilustra a diversidade de propriedades biológicas como antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória, imunomoduladora, hipotensiva, cicatrizante, anestésica, antitumoral e anticarcinogênica, dentre outras (AMINIMOGHADAMFAROUJ; NEMATOLLAHI, 2017).

Entre os principais compostos responsáveis pelos efeitos benéficos da própolis destacam-se os flavonoides. São definidos como compostos fenólicos provenientes de plantas, que agem em diferentes processos fisiológicos, atuando na ação e absorção de vitaminas, nos processos de cicatrização como antioxidantes e exercendo função antimicrobiana e moduladora do sistema imune (FERNANDES JÚNIOR *et al.*, 2006).

A própolis tem sido referida como um excelente candidato para gerenciamento de queimaduras, aumentando a proliferação celular, ativação e capacidade de crescimento. A eficácia terapêutica da própolis foi verificada através de análises quantitativas e qualitativas da expressão e degradação de colágeno tipo I e III na matriz de feridas, indicando que a própolis poderia induzir um ambiente bioquímico favorável que pode levar à reepitelização (JACOB *et al.*, 2015).

A atividade cicatrizante da própolis pode ser correlacionada com suas propriedades antimicrobianas, anti-inflamatórias e imunomoduladoras. Hozzein *et al.*, (2015) investigaram os efeitos da aplicação tópica de própolis na cicatrização e fechamento de feridas em modelo de rato com DM1 induzido por estreptozotocina, mostrando que a própolis acelerou o fechamento da ferida por maior expressão de TGF- β , bem como aumento da expressão e deposição de colágeno tipo I, redução de metaloproteases de matriz e diminuição da inflamação.

Recentemente, as evidências científicas sobre as propriedades cicatrizantes da própolis têm aumentado, embora o número de estudos pré-clínicos *in vivo* que

investigam estas propriedades em modelos animais ainda seja limitado (PEREIRA, BÁRTOLO, 2016).

O tratamento à base de própolis estimula aumentos significativos nos componentes da matriz extracelular durante a fase inicial do reparo da ferida, pressupondo-se que este efeito está associado à sua capacidade de estimular a expressão do TGF- β que participa nas fases iniciais do reparo da ferida, como hemostasia e inflamação (MARTINOTTI e RANZATO, 2015).

McLennan *et al.*, (2008) avaliaram o efeito de uma única aplicação de própolis em feridas cutâneas de ratos com DM induzida por estreptozotocina. As áreas da ferida foram avaliadas histologicamente nos intervalos de 6 e 12 dias sendo concluído que a aplicação tópica da própolis preveniu os efeitos negativos do DM na cicatrização, normalizando os índices de fechamento de ferida e reduzindo a infiltração neutrofílica persistente e a atividade da elastase. Em conjunto, os achados do trabalho indicaram que a própolis acelera o processo de cicatrização de feridas em ratos diabéticos.

Em estudo piloto conduzido por Henshaw, et al (2014), pacientes afetados por úlcera do pé diabético foram tratados com própolis aplicada semanalmente, durante 6 semanas em aplicação tópica, demonstrando ser uma terapia bem tolerada e viável para a cicatrização de feridas, por não apresentar efeitos adversos, além de apresentar uma contagem de bactérias menor e um fechamento da ferida mais rápido nos indivíduos tratados com a própolis.

2. JUSTIFICATIVA

Como relatado, estudos experimentais anteriores demonstraram que tanto o uso tópico de própolis quanto o laser de baixa potência têm apresentado resultados favoráveis na cicatrização de úlceras cutâneas em pacientes e animais diabéticos. Todavia, ainda existem lacunas quanto à utilização de ambos tratamentos pela variabilidade nos parâmetros do laser e formulação da própolis, além de ser inexistente na literatura algum possível efeito positivo da associação dos dois agentes na contração da ferida em animais diabéticos, constituindo esta a justificativa principal do presente trabalho. Espera-se que os resultados possam subsidiar futuros estudos clínicos, visando o estabelecimento de uma terapia mais efetiva para as feridas cutâneas e consequente melhoria da qualidade de vida de portadores do DM.

3. OBJETIVOS

3.1 – Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da associação da fotobiomodulação e da administração tópica de própolis em um modelo de ferida cutânea em ratos com diabetes tipo 1 induzida por estreptozotocina.

3.2 – Objetivos Específicos

- Avaliar a contração da ferida durante o processo de cicatrização, por meio de medições periódicas da área da ferida;
- Avaliar a organização e orientação das fibras colágenas por birrefringência óptica dos espécimes;
- Analisar a organização do colágeno sob microscopia de fluorescência dos espécimes;
- Correlacionar os resultados das análises por birrefringência com organização do colágeno sob microscopia de fluorescência;
- Quantificar o número de mastócitos totais, íntegros e em degranulação;
- Quantificar o número de miofibroblastos;
- Quantificar o número de vasos neoformados.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 – Princípios Éticos

A permissão para realização do estudo foi concedida mediante aprovação do projeto de pesquisa submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte com o Parecer 036/2015 (Anexo I). Todos os procedimentos foram realizados de acordo com princípios éticos recomendados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e de acordo com a lei nº 11.794, Lei Arouca – Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (Brasil, 2008).

4.2 – Delineamento do estudo, população e amostra

Estudo de caráter experimental *in vivo*, do tipo longitudinal, prospectivo e controlado, com amostra composta por 90 (noventa) ratos machos (*Rattus norvegicus albinus*) da linhagem *Wistar*, com peso aproximado de 275 ± 25 g e 2 meses de idade, provenientes do Biotério do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN). Os animais foram acondicionados na Sala de Experimentação Animal do Departamento de Morfologia, em gaiolas de polipropileno, em número de 3 ou 4 animais, com luminosidade controlada em regime claro/escuro 12h, temperatura entre 22 e 23°C, umidade controlada e ingestão de água e ração Presence (Purina, Brasil) *ad libitum*. Os animais permaneceram acondicionados no biotério durante 6 dias anteriores ao estudo para adaptação ao meio e manuseio.

4.3 – Grupos experimentais

Os animais (n=90) foram divididos em cinco grupos (n=18 cada), de acordo com indução do DM e o tratamento adotado após a indução da lesão por intervenção cirúrgica:

- **Normoglicêmico (N)** – não diabético, sem terapia complementar;
- **Controle (C)** – diabético, sem terapia complementar;
- **Laserterapia (L)** - diabético, irradiado com laser de baixa potência;
- **Própolis (P)** - diabético, submetido à administração tópica de própolis;
- **Laserterapia + Própolis (LP)** - diabético, submetido à irradiação com laser de baixa potência associada à administração tópica de própolis.

Utilizaram-se 6 animais em cada intervalo experimental (7, 14 e 21 dias) nos diferentes grupos para avaliação histológica (Zhu *et al.*, 2011), necessários para o tratamento adequado das variáveis estatísticas estudadas.

4.4 – Indução do Diabetes

Os animais foram mantidos em jejum por 12 horas, pois nessas condições tornam-se mais propenso a indução do DM. Posteriormente, os animais foram anestesiados com isoflurano (Vetflurano®, Virbac, Brasil) por via inalatória, na dose de 1,25 cc/Kg e o DM1 foi induzido através de injeção intraperitoneal de estreptozotocina (Cayman Chemical, USA), na dose de 35 mg/Kg de peso corporal, diluída em tampão citrato (10 mmol/L, pH 4.5). Para constatar o quadro de DM através do índice glicêmico, realizou-se uma punção da veia da caudal mediana após jejum (12 horas), sendo colocada uma gota sobre fitas reagentes e a leitura em um aparelho Accu Chek Active (Roche, Suíça).

4.5 – Avaliação da Glicemia

A glicemia foi monitorada antes do procedimento de indução do DM; 5 dias após a indução; no 20º dia após a indução (início dos experimentos); e no dia da eutanásia, para avaliar qualquer processo de reversão do DM. Os animais com glicemia superior a 220 mg/dL em jejum foram considerados diabéticos, sendo removidos do estudo animais com valores inferiores (de Loura Santana *et al.*, 2015). Outros sinais clínicos importantes, como poliúria e polidipsia, foram auxiliares no diagnóstico do DM.

4.6 – Produção das feridas cutâneas

Seguindo a metodologia empregada por De Loura Santana *et al.*, (2015), nos animais diabéticos, as feridas cirúrgicas foram realizadas 15 dias após a confirmação do DM, para que o 21º dia de experimento coincidissem com o período de pico de glicose no sangue (Kataota *et al.*, 2013).

Após os animais alcançarem o plano anestésico adequado com isoflurano (Vetflurano®, Virbac, Brasil) por via inalatória, na dose de 1,25 cc/Kg de peso, foi realizada tricotomia da região dorsal. Em seguida, foi realizada uma lesão circular com 10 mm de diâmetro, utilizando tesoura cirúrgica curva fina de 15 cm (Stark, Brasil), sendo removidos epiderme, derme e tecido subcutâneo. Em todos os ratos, o

procedimento cirúrgico foi realizado pelo mesmo operador e após cirurgia, os animais receberam cloridato de tramadol (Tramal®, Medley, Brasil), na dose única de 20 mg/kg, por via intramuscular para evitar dor. Os animais foram examinados diariamente, anotando-se as condições da ferida e suas complicações nas fichas-protocolo para verificação da presença de crostas, secreções e cicatriz hipertrófica.

4.7 – Laserterapia

Após produção das feridas cirúrgicas, foi iniciado o tratamento com laser nos animais dos grupos Laser (L) e Laser associado à Própolis (LP), utilizando-se aparelho de Laser diodo (Kondortech – Bio Wave LLLT Dual, Brazil), de InGaAlAs (Kondortech. Brasil) utilizando método de aplicação pontual com a caneta posicionada perpendicularmente ao tecido, irradiado à 0,5cm da superfície com modo de ação contínuo, aplicação única (centro da ferida), utilizando o comprimento de onda de 660nm (vermelho), potência 30mW, diâmetro da ponta de 0,01 cm², fluência de 4 J/cm², com tempo total de 2 min e 13 segs. As irradiações foram efetuadas no momento imediato após a cirurgia e posteriormente a cada 24 horas, por 6 dias. No grupo LP, a laserterapia precedeu a aplicação tópica da própolis, para evitar a interferência da solução na irradiação.

4.8 – Administração da Própolis

Foi utilizada a própolis do arbusto alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*), conhecida como própolis verde, que é produzida nos ápices vegetativos desta planta em várias regiões do Brasil (VIEIRA, 2008), obtidas de um mesmo lote comercial, a partir da própolis verde (extrato seco mínimo de 11% p/v) e álcool neutro, produzido pela Apis Flora Industrial e Comercial Ltda. (Registro no Ministério da Agricultura – SIF/DIPOA sob o nº 0029/3733). A caracterização química do extrato foi publicada anteriormente (Berretta *et al.*, 2012): 7,553 mg/mL de artepilina C; 2,261 mg/mL de isosacuranetina; 1,561 mg/mL de ácido p-cumárico; 1,020 mg/mL de aromadendrina; 0,299 mg/mL de ácido cafeico; e 0,091 mg/mL de ácido trans-cinâmico. O extrato alcoólico da própolis foi aplicado topicamente nos animais dos grupos Própolis (P) e Laserterapia associada à Própolis (LP) imediatamente após a realização da ferida cirúrgica e reaplicada diariamente por 6 dias.

4.9 – Avaliação macroscópica do fechamento da ferida

As feridas induzidas foram fotografadas imediatamente após o processo cirúrgico (dia 0) e nos intervalos de 7, 14, e 21 dias após a indução da lesão, utilizando câmera digital (Sony®, modelo DSC-W570 16.1 Megapixels) fixada em tripé à uma distância padrão de 34 cm da ferida cirúrgica. As fotografias foram importadas para o software ImageJ (v.1.45) para mensuração da área da ferida, obtendo-se em seguida o coeficiente de contração através da fórmula: $(\text{área inicial} - \text{área do dia da medida}) \div \text{pela área inicial} \times 100 = \text{percentual de contração no dia da medida}$ (ZHANG *et al.*, 2015).

4.10 – Obtenção e processamento análise dos espécimes teciduais

Nos intervalos de 7, 14 e 21 dias pós-cirurgia, os animais foram identificados, pesados e submetidos à aferição da glicemia. Em seguida, foi utilizado solução de lidocaína a 8 mg/Kg e tiopental sódico a 180 mg/Kg por via intraperitoneal, para induzir a eutanásia, constatada pela ausência de reflexo palpebral, movimentos torácicos e de batimentos cardíacos durante dois minutos. Em seguida, as amostras de tecido cicatricial foram removidas, preservando-se uma margem de 5 mm a partir das bordas da ferida primária (10 mm de diâmetro). Os fragmentos destinados à histologia foram fixados em solução tamponada de formaldeído a 10% (pH 7.4), por 24 horas. Após esse período, os espécimes foram processados, incluídos em parafina e submetidos a microtomia com cortes de 3 a 5µm de espessura. As carcaças foram encaminhadas para descarte, de acordo com o protocolo de descarte de material biológico do Centro de Biociências da UFRN.

4.11 – Análise do conteúdo e orientação das fibras de colágeno

Após a microtomia, os cortes com 5 µm de espessura foram coletados em lâminas e mantidos em estufa à 60° C por 12 horas para adesão. Em seguida foram submetidos aos processos de desparafinização em xilol e hidratação em banhos decrescentes de soluções de álcool etílico e por último água destilada. Posteriormente, foram corados com hematoxilina de Weigert por 8 minutos, e lavados por 10 min em água corrente. Posteriormente, as lâminas foram coradas com *Picrosirius Red* por 1h, lavadas em duas imersões de água acidificada, desidratados

em 3 imersões de álcool etílico à 100%, imersas em xilol e montadas em meio resinoso (Entelan®).

Foram fotografados 3 campos da lesão e 2 campos de tecido sadio de cada lâmina com ampliação de 20 e 40x utilizando um microscópio com sistema de luz polarizada (Nikon Eclipse MA100) acoplado a uma câmera para captura de imagem (Nikon DS-Fi2). Cada campo digitalizado representou uma resolução de 640x480 pixels. Todas as imagens foram digitalizadas com o mesmo padrão de intensidade de luz do microscópio, altura do condensador e angulação da lente polarizada.

A análise da distribuição das fibras de colágeno foi realizada pelo software ImageJ (NIH, EUA), onde as fibras de colágeno foram diferenciadas de acordo com o padrão de birrefringência. As fibras densas e espessas se apresentam com coloração próxima a vermelho e laranja e o colágeno mais fino apresentam cores entre amarelo a verde. A quantificação da fração total de colágeno foi realizada pela das áreas de colágeno fino e espesso (RAM, 2016).

No sentido de medir a organização do colágeno, foi utilizado uma adaptação para o ImageJ do algoritmo “*fast Fourier transform*” (FFT) para obter um espectro de potência FFT bidimensional de cada imagem. A orientação do feixe de colágeno foi estimada calculando-se a razão largura/comprimento do máximo da escala zero no gráfico de potência gerada da imagem. Este foi denominado índice de orientação do colágeno, que pode variar entre 0 e 1. A orientação paralela do colágeno resulta em um espectro de energia alongado que leva a um índice de orientação próximo de 1 e a orientação perfeitamente aleatória do tecido resulta em um índice de orientação que se aproxima de 0 (ZUIJLEN, *et al.*, 2002).

Adaptando a metodologia utilizada por Vogel, *et al.*, 2015 para determinar o conteúdo de colágeno utilizando microscopia de fluorescência, as imagens da lesão (3 capturas) e do tecido sadio (2 capturas) foram obtidas através de uma câmera (Nikon DS-Ri1) acoplada ao microscópio de fluorescência (Nikon Ni-U) nos filtros FITC e rodamina, com tempo de exposição fixo de 250 ms para cada canal sem aprimoramentos de imagem adicionais, sendo digitalizadas pelo *software* NIS Elements Ar®. Os canais vermelho e verde foram exportados para o Adobe Photoshop 7.0, sendo reduzidos a escala de cinza e em seguida, as duas imagens foram mescladas para medir a área sem orifícios de tecido e espaços vazios. Para determinar a área de colágeno corrigido de fundo na imagem, o tecido viável (canal verde) foi subtraído da imagem de colágeno (canal vermelho) resultando na área de

colágeno corrigida em segundo plano. A relação entre a área de tecido total sem espaços vazios e colágeno corrigido em segundo plano foi definida como o conteúdo relativo de colágeno no campo de visão expresso em porcentagem.

4.12 Quantificação de mastócitos totais e em degranulação

As lâminas de cada animal com cortes de 5 μ m foram coletados em lâminas e permaneceram por 12h em estufa à 60 $^{\circ}$ C para adesão. Os processos seguintes foram de desparafinização em xilol e hidratação em banhos decrescentes de soluções de álcool etílico e por último, água destilada. Por fim, as lâminas foram imersas em solução de azul de toluidina a 0,2% por 1 minuto. Logo após, os espécimes foram enxaguados em 3 trocas de água destilada e desidratados rapidamente através de álcool 95% e absoluto, para posterior imersão em xilol e montagem com meio de resina sintética (Entelan[®]).

As lâminas foram escaneados através do software Pannoramic Viewer 1.15.4 for Windows (3D Histech, Hungary) e avaliadas através do software ImageJ (NIH, USA) utilizando o Plugin Cell Counter. Adaptando a metodologia de Bargheri, *et al.*, (2018) foram contados os mastócitos em toda a área da ferida cirúrgica. O grau de degranulação nos mastócitos permitiu a identificação de três tipos de mastócitos por microscopia de luz, representando as três etapas de degranulação de mastócitos: Mastócitos Tipo 1 (MCT1), mastócitos intactos; Mastócitos Tipo 2 (MCT2), mastócitos com grânulos já liberados, no entanto as bordas das células permaneciam intacta; e Mastócitos Tipo 3 (MCT3), mastócitos com enorme degranulação e desintegração completa ou parcial da borda celular (Fig. 1a-c).

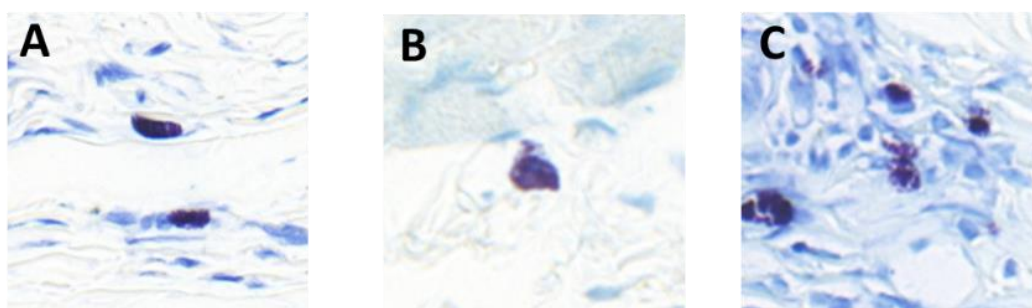


Figura 1. Etapas de degranulação dos mastócitos em tecido cutâneo corado com Azul de Toluidina. **(A)** MCT1, **(B)** MCT2, **(C)** MCT3. **Fonte:** Produção do autor, seguindo os parâmetros preconizados por Bargheri, *et al.*, (2018).

4.13 Expressão imunoistoquímica (α -SMA e CD105)

A partir dos espécimes das feridas fixados em formaldeído (10%) e incluídos em parafina, foram obtidas secções teciduais (3 μ m), posteriormente estendidas em lâminas histológicas preparadas com adesivo à base de organosilano (3-aminopropyltriethoxisilano, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Em seguida, o material biológico foi submetido à técnica da imunoperoxidase, conforme os passos descritos a seguir.

Para as etapas de desparafinização, reidratação e, no caso do CD105, recuperação antigênica, as secções foram submetidas ao *Trilogy* (Cell Marque; Rocklin, CA, USA), na concentração 1:100, em panela Pascal. Para o α -SMA, a recuperação antigênica não foi realizada. Em seguida, foram imersas em peróxido de hidrogênio (3%) para o bloqueio da peroxidase endógena, lavadas em água corrente e incubadas em proteína Block (ThermoScientific, Runcorn, USA), por 5 minutos, à temperatura ambiente, para o bloqueio de ligações inespecíficas. Posteriormente, foram realizadas duas lavagens em tris-hidroximetil-aminometano (TRIS, Sigma Chemical, St Louis, MO, USA), seguidas de incubação com os anticorpos primários em câmara úmida (Quadro 1). Os anticorpos foram detectados pelo sistema de visualização HiDef (Cell Marque; Rocklin, CA, USA). As reações foram desenvolvidas com diaminobenzidina (Liquid DAB + Substrate; Dako, Carpinteria, CA, USA) como cromógeno, e as secções teciduais, contracoradas em hematoxilina de Mayer. Finalmente, foram realizadas as etapas de desidratação, diafanização e montagem das lamínulas contra as lâminas em resina *Erv-mount* (EasyPath, Brazil).

Cortes histológicos de placenta humana e leiomioma uterino humano foram utilizados como controles positivos para os anticorpos CD105 e α -SMA, respectivamente. O controle negativo consistiu na omissão dos anticorpos primários, sendo substituídos por albumina de soro bovino (1%) em PBS.

Quadro 1. Especificações dos anticorpos primários utilizados na técnica imunoistoquímica.

Especificidade	Clone	Fabricante	Diluição	Recuperação antigênica	Incubação
CD105	SN6h	Dako	1:100	<i>Trilogy</i> , 1:100, Pascal, 30 min	<i>Overnight</i> (18h)
α -SMA	1A4	Dako	1:500	Sem recuperação	60 min

Os cortes foram então digitalizados através do escâner de lâminas Panoramic MIDI II (3D Histech, Hungary) e as áreas das imagens digitais foram selecionadas através do software Panoramic Viewer 1.15.4 for Windows (3D Histech, Hungary) e avaliadas através do software ImageJ 1.45 (NIH, USA), utilizando o plugin Cell Counter, para contagem de miofibroblastos (α -SMA) e vasos (CD105).

Para avaliação da presença de miofibroblastos, a metodologia empregada foi adaptada de Loura-Santana, *et al.*, (2015) e de Santos, *et al.*, (2017), onde foram fotografados 5 campos de maior imunorreatividade ao anticorpo anti- α -SMA no leito da ferida. Em cada campo, foram quantificadas as células positivas, excluindo-se as células situadas no lúmen de vasos sanguíneos.

Para avaliação de vasos sanguíneos, adaptando a metodologia utilizada por Meyer, *et al.*, (2017), cinco campos de maior presença de vasos positivamente marcados no leito da ferida foram fotografados. A quantificação total ocorreu pela soma da quantidade de vasos presentes nos 5 campos.

4.14 – Análise Estatística

Os dados quantitativos obtidos foram comparados nos diferentes intervalos e grupos pelo *software* GraphPad Prism® 6.0 (GraphPad Software Inc., USA). Para os dados com distribuição normal, foi realizado ANOVA, seguido do pós-teste de *Tukey* para comparação entre as médias dos cinco grupos nos três intervalos temporais. Os dados que apresentaram distribuição não normal, tiveram as médias comparadas através do teste de Kruskal-Wallis entre os cinco grupos e intervalos dos grupos e, quando identificada diferença estatística no grupo, os dados foram submetidos ao teste de Mann-Whitney para identificação entre os pares. A análise de correlação entre os métodos de quantificação do colágeno, utilizou-se o coeficiente de correlação de Pearson. Foi considerando-se um intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$)

5. RESULTADOS

5.1 Fechamento da Ferida

Na avaliação macroscópica foi possível observar que a contração da ferida nos diferentes grupos ocorreu progressivamente (Figuras 2 e 3), demonstrando um aspecto clínico da área de cicatriz maior e mais delgada no grupo C em relação aos demais grupos. As feridas não apresentaram sinais clínicos de edema, infecção ou outras intercorrências ao longo do experimento.

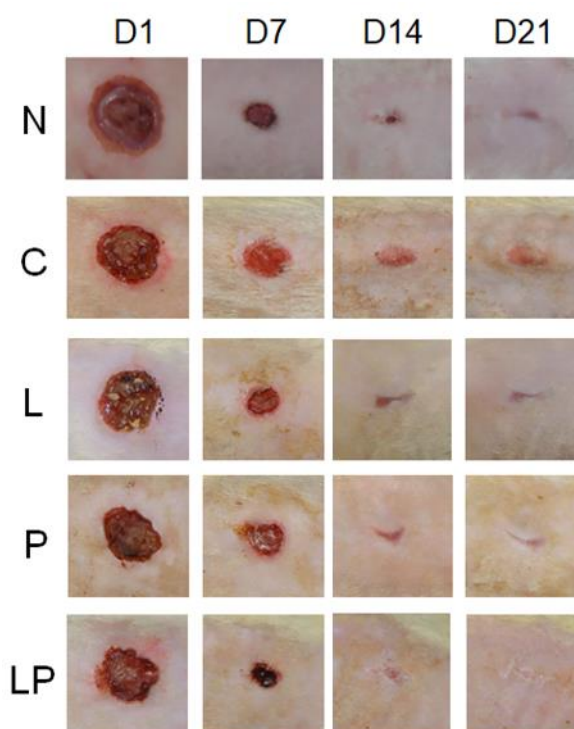


Figura 2. Aspecto macroscópico das feridas, com retração progressiva das lesões ao longo do experimento nos diferentes grupos estudados. **Legenda:** D: dia (intervalo experimental); N: normoglicêmico; C: diabético controle (não tratado); L: diabético tratado com laserterapia; P: diabético tratado com aplicação tópica de própolis; LP: diabético tratado com laserterapia associada a aplicação tópica de própolis.

Nos três grupos induzidos o diabetes e submetidos a procedimentos terapêuticos (L, P e LP) houve um fechamento da ferida mais rápido em relação ao grupo C ($p < 0,05$) a partir do 14º dia, com resultado semelhante ao grupo N (Figura 3 e 4). O grupo LP apresentou um melhor resultado em relação aos demais ($p < 0,001$) a partir do 7º dia, não havendo diferença ao 21º dia experimental.

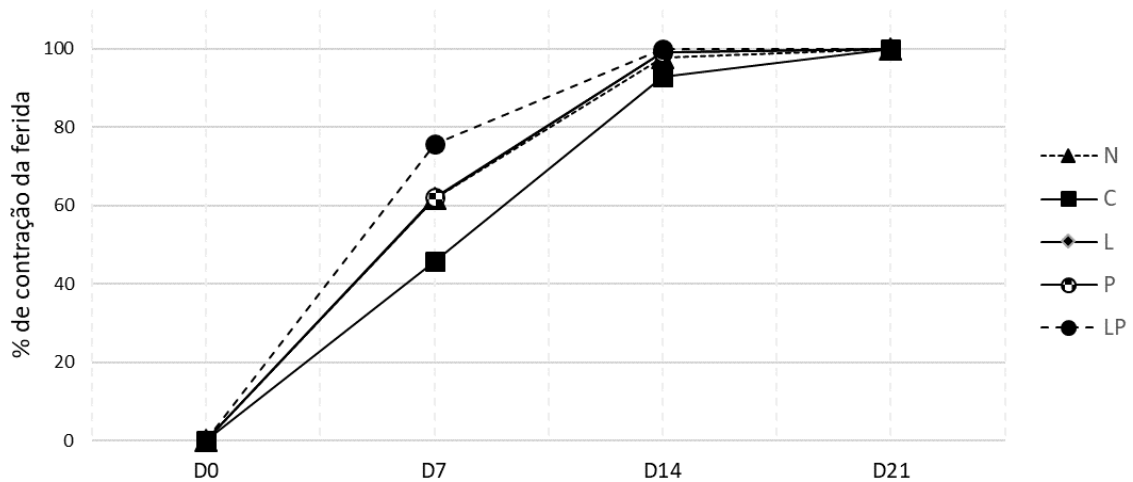


Figura 3. Curva obtida do coeficiente de contração das feridas nos grupos estudados ao longo do experimento. Observa-se um padrão crescente de contração da ferida nos grupos tratados, especialmente o grupo LP.

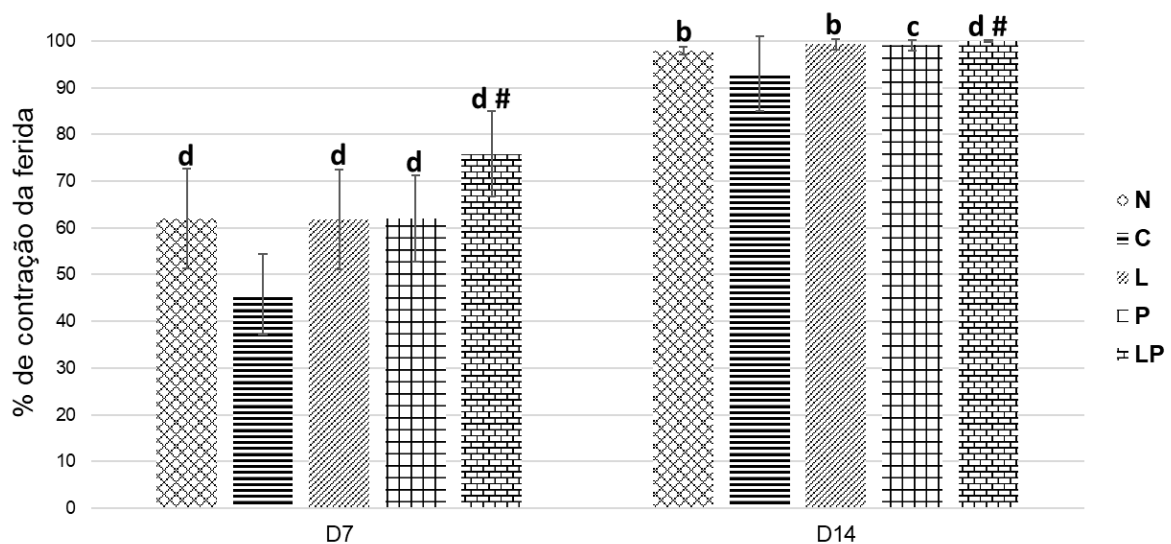


Figura 4. Coeficiente de contração das feridas cutâneas dos grupos estudados nos dias que houveram diferença estatística. Os dados estão expressos em média \pm erro padrão da média. Letras representam diferença estatisticamente significativas em relação ao grupo C (controle diabético não tratado); b: $p < 0,01$; c: $p < 0,001$; d: $p < 0,0001$. # representa diferença significativa com os demais grupos tratados ($p < 0,05$). (Teste de Mann-Whitney).

5.2 Conteúdo e Organização das Fibras de Colágeno

A análise quantitativa do conteúdo de colágeno fotografado sob luz polarizada demonstrou um aumento em sequência na área total de colágeno em cada grupo, no entanto, ao 7º dia observou-se uma redução da área de colágeno no grupo C quando comparado aos grupos N e LP ao dia 7 ($p < 0,05$). No dia 21, houve um aumento na

área total de colágeno nos grupos L, P e LP quando comparados aos grupos N e C ($p < 0,05$) (Figura 5A-B).

Ao avaliar o conteúdo de colágeno sob fluorescência, observou-se uma presença maior de colágeno no grupo P quando comparado aos grupos C e LP ao 7º dia. Nos dias 14 e 21, o grupo C apresentou uma diminuição significativa quando comparado aos demais grupos, entretanto, no 14º a produção de colágeno do grupo L foi ainda maior do que os grupos P e LP ($p < 0,05$) (Figura 5A e C).

Após a quantificação por estratos de cores usando o Image J, foi observada uma diminuição significativa da área de fibras espessas (vermelho alaranjado) de colágeno do grupo C quando comparado aos grupos L, P e LP ao 7º dia, e um aumento do grupo L quando comparado aos grupos C e LP ao 14º dia ($p < 0,05$). Ao final do experimento (dia 21), observou-se uma maior área de fibras espessas no grupo LP em relação ao grupo C ($p < 0,05$) (Figura 6A).

Ao mesmo tempo, ao avaliar o conteúdo em área das fibras finas, observou-se que um aumento do conteúdo de fibras no grupo L em comparação aos grupos P e LP e uma diminuição das fibras do grupo P em relação ao grupo N no 7º dia. Houve uma redução significativa das fibras finas no grupo L ao 14º dia quando comparado aos demais grupos. Ainda no dia 14, o grupo P apresentou uma redução da área de suas fibras quando comparado ao grupo C ($p < 0,05$). No 21º dia, houve um aumento nas fibras finas do grupo L quando comparado aos demais grupos ($p < 0,05$) (Figura 6B).

A comparação entre as médias avaliados por luz polarizada e fluorescência demonstrou uma diferença estatisticamente significativa na avaliação do leito da ferida ($p < 0,05$). A quantificação do colágeno sob luz polarizada (birrefringência) apresentou uma correlação positiva forte com a quantificação feita sob fluorescência no tecido sadio ($r = 0,7559$; $p < 0,0001$). No entanto, ao ser testada a correlação entre os métodos na quantificação da área da ferida, foi observado uma correlação positiva moderada ($r = 0,5446$; $p < 0,0001$) (Figura 7 A–D).

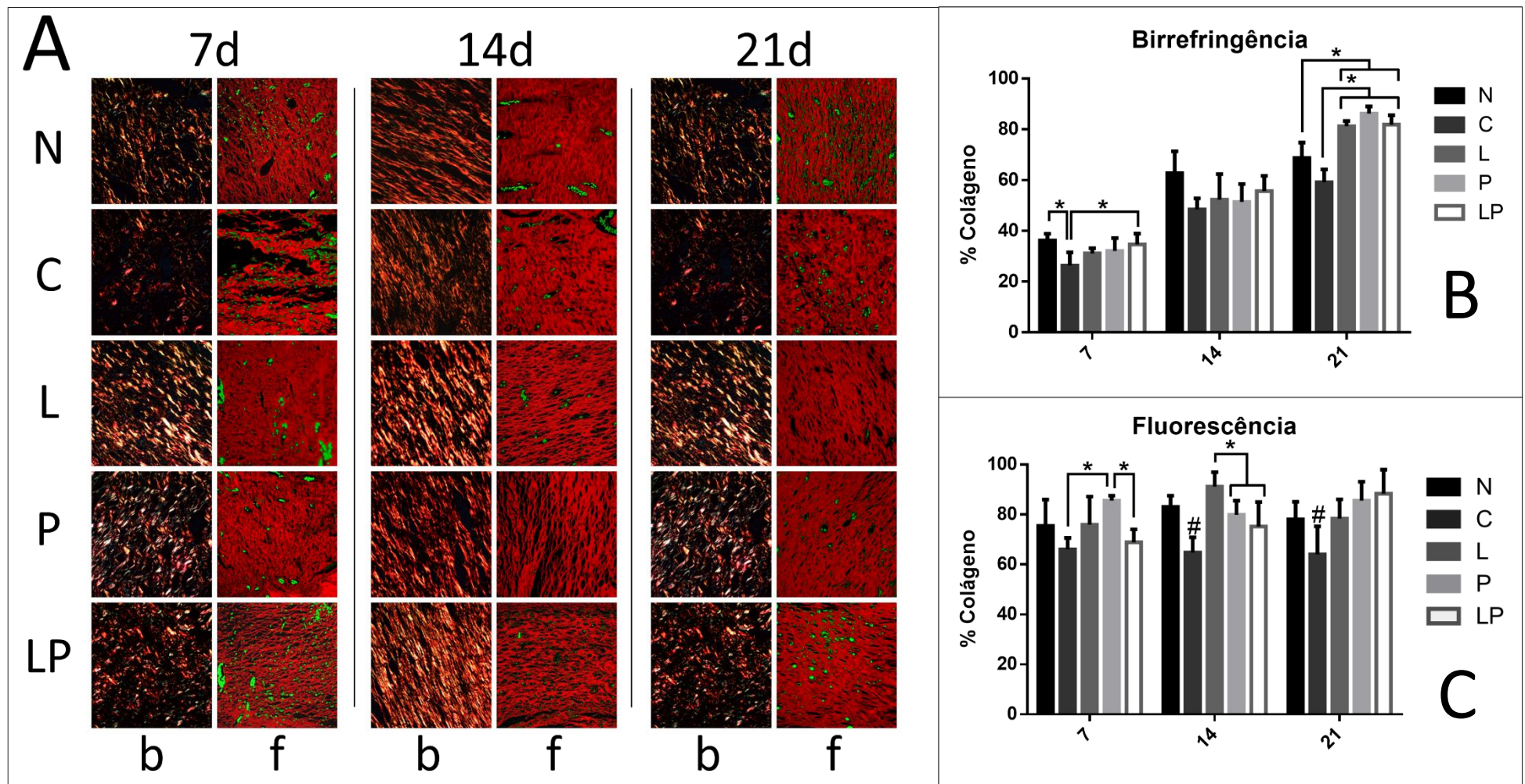


Figura 5. Fotomicrografias das feridas coradas com Picosirius Red avaliados por microscopia de luz polarizada (b) e fluorescência (f) ao longo dos tempos experimentais (A) (Aumento: 20x). Área total de colágeno das feridas cutâneas avaliadas sob luz polarizada e birrefringência das fibras nos grupos estudados ao longo do experimento (B). Área total de colágeno das feridas cutâneas avaliadas sob microscopia de fluorescência nos grupos estudados ao longo do experimento (C). Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão da média. * $p < 0,05$; # representa diferença significativa com os demais grupos tratados ($p < 0,05$). (ANOVA com pós teste de Tukey).

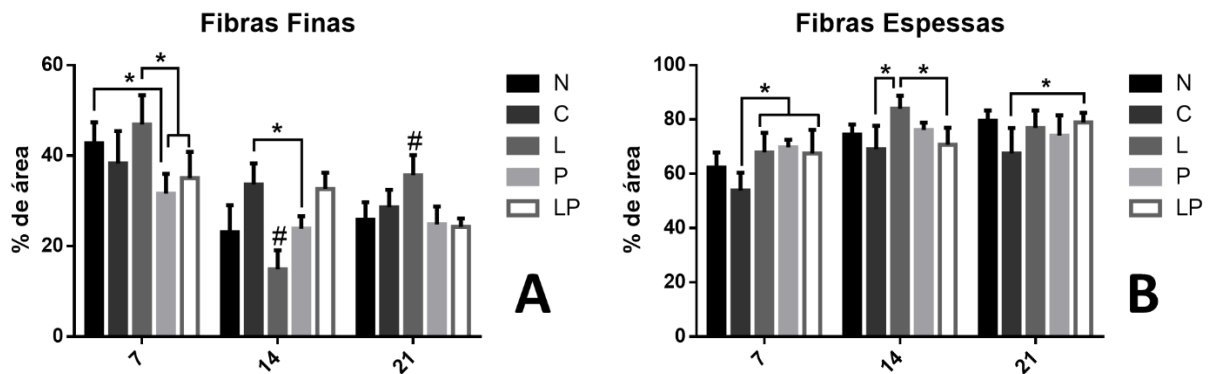


Figura 6 Porcentagem de fibras finas (A) e fibras espessas (B) de colágeno após separação das cores por birrefringência analisadas sob luz polarizada. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão da média. * $p < 0,05$; # representa diferença significativa com os demais grupos tratados ($p < 0,05$). (ANOVA com pós teste de Tukey)

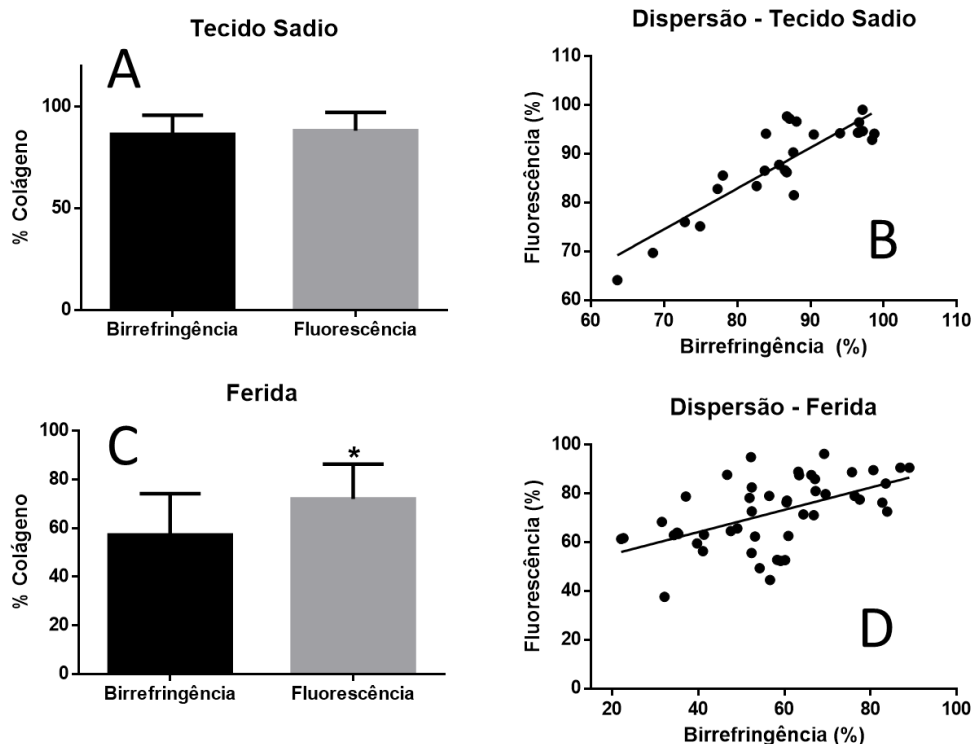


Figura 7. Comparação entre os métodos de avaliação do colágeno por birrefringência e Fluorescência e gráfico de dispersão da correlação entre os métodos de quantificação do colágeno no tecido sadio, adjacente à lesão (A) e no leito da ferida (B). * $p < 0,05$; Teste-t pareado e Correlação de Spearman (A-B); Teste de Wilcoxon e Correlação de Pearson (C-D).

A organização das fibras de colágeno, obtida pela orientação dos feixes de colágeno demonstrou uma orientação significativamente mais aleatória dos grupos L e LP quando comparados ao grupo C nos dias 7 e 14 ($p < 0,05$). No 7º dia, o grupo L

ainda apresentou feixes mais aleatórios em relação ao grupo P, e no 21º ao grupo C ($p < 0,05$) (Figura 8).

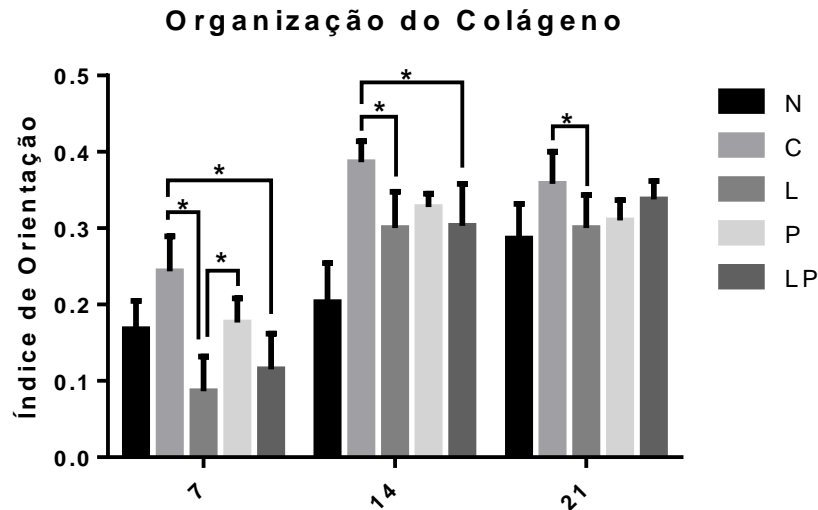


Figura 8. Índice de orientação das fibras de colágeno, obtido por análise no Image J através do plugin *fast Fourier transform*. Valores próximo a 0 indicam uma organização mais paralela das fibras, enquanto valores mais próximos a 1, indicam uma maior aleatoriedade. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão da média. * $p < 0,05$; # representa diferença significativa com os demais grupos tratados ($p < 0,05$). (ANOVA com pós teste de Tukey)

5.3 Mastócitos

Os resultados do número de MCT1, MCT2, MCT3 e total de mastócitos nos dias 7, 14 e 21 estão expressos na figura 9 (A–D).

Foi observado diferenças estatisticamente significativas de MCT1 no 7º dia, havendo uma diminuição do número de MCT1 nos grupos L e LP quando comparados ao C. O grupo LP ainda apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos N e P. Ao 14º dia, o grupo C manteve um elevado número de MCT1 quando comparado aos demais grupos. No dia 21, o grupo LP, exibiu uma menor quantidade de MCT1, quando comparado aos grupos C e L (Figura 9B).

Os grupos L e LP apresentaram uma quantidade reduzida de MCT2 ao 7º dia em relação ao grupo C. O número de MCT2 do grupo C se manteve elevado ao 14º dia, estando significativamente diferente dos demais grupos. No dia 21, a quantidade de MCT2 do grupo LP se manteve reduzido em comparação aos grupos C e L, havendo diferenças estatisticamente significativas na comparação entre esses grupos (Figura 9C).

A contagem de MCT3 demonstrou uma diminuição significativa do número de células no grupo LP em comparação aos demais grupos no dia 14, mantendo-se significativamente reduzido ao 21º dia quando comparado aos grupos C e P. Ainda no 21º dia, a quantidade de células do grupo C foi estatisticamente maior, quando comparado aos grupos N e L (Figura 9D).

Particularmente, o grupo LP, apresentou uma quantidade total de mastócitos diminuído quando comparado ao grupo C nos dias 7, 14 e 21 ($p < 0,05$). Ao 7º dia, o grupo L apresentou uma quantidade diminuída de mastócitos em relação ao grupo C e N ($p < 0,05$). No 14º dia, destaca-se o elevado número de mastócitos do grupo C, permanecendo alto em relação aos demais grupos e ainda uma diminuição do número de mastócitos do grupo LP quando comparado aos grupos L e P ($P < 0,05$). No 21º dia, a quantidade de mastócitos do grupo LP foi estatisticamente menor do que o grupo L também ($p < 0,05$) (Figura 9E).

5.5 Miofibroblastos

A contagem de miofibroblastos pela expressão imunohistoquímica de α -SMA, mostrou uma produção reduzida de miofibroblastos do grupo C em relação a todos os grupos nos dias 7, 14 e 21. No entanto, houve um aumento significativo no grupo LP em relação ao grupo C e grupo P no 14º dia ($p < 0,05$). No 7º e 21º dia, os grupos P e L, respectivamente demonstraram uma maior quantidade de miofibroblastos quando comparados ao grupo C ($p < 0,05$) (Figura 10 A–F).

5.6 Densidade Vascular

A contagem de vasos neoformados pela expressão de CD105 demonstrou uma redução no número de vasos do grupo C em relação aos demais grupos nos dias 7, 14 e 21. Houve um aumento significativo de vasos no grupo P quando comparado ao grupo C no dia 7, e aos grupos C e L no 21º dia ($p < 0,05$). O grupo LP apresentou uma maior quantidade de vasos quando comparado aos grupos C e P no dia 14 ($p < 0,05$) (Figura 11 A–F).

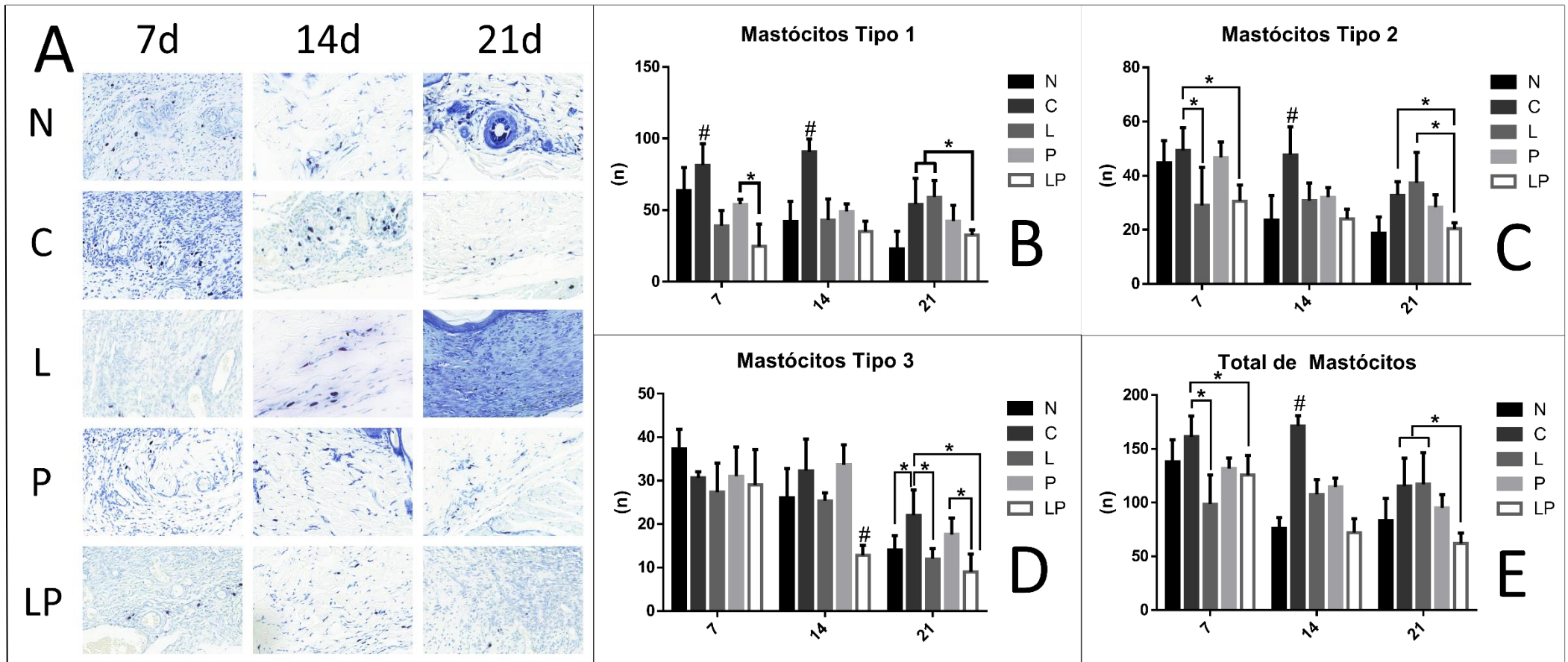


Figura 9. Fotomicrografias das feridas coradas com Azul de Toluidina, evidenciando a presença de mastócitos nos diferentes grupos ao longo do experimento (A) (Aumento: 40x). Os gráficos representam a média \pm desvio padrão do número de MCT1 (B), MCT2 (C), MCT3 (D) e total de Mastócitos (E), comparados por ANOVA com pós teste de Tukey. * $p < 0,05$; # representa diferença significativa com os demais grupos tratados ($p < 0,05$).

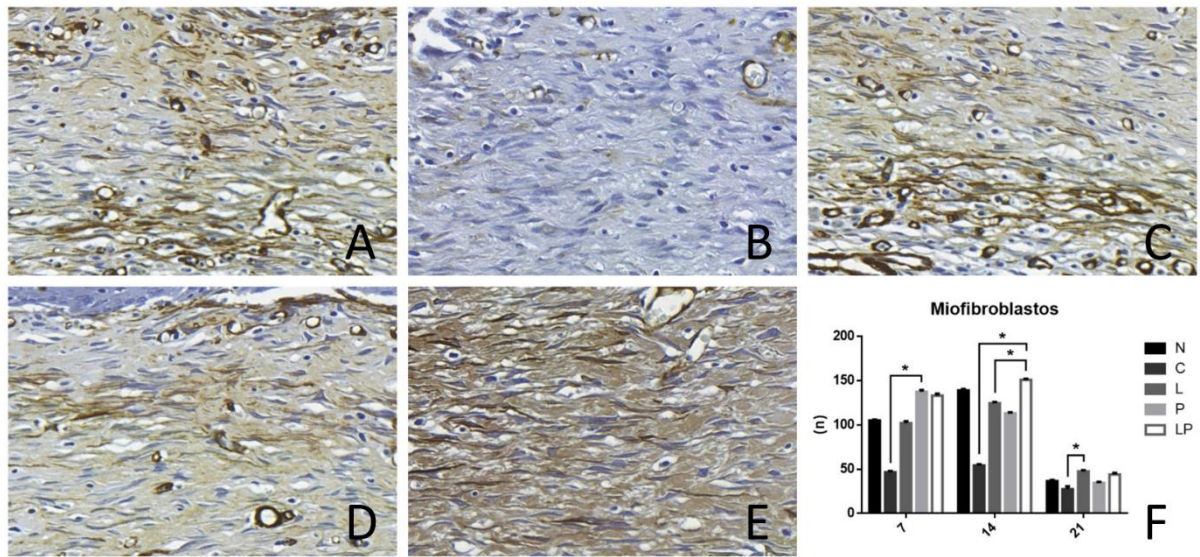


Figura 10. Expressão imunoistoquímica de α -SMA dos grupos N, C, L, P e LP (A–E, respectivamente) ao 14^o dia de experimento (Aumento: 40x). O gráfico (F), representa a média \pm desvio padrão do total de miofibroblastos nos grupos ao longo do experimento, comparados por teste de Kruskal Wallis e comparados individualmente com teste de Mann-Whitney; * $p < 0,05$.

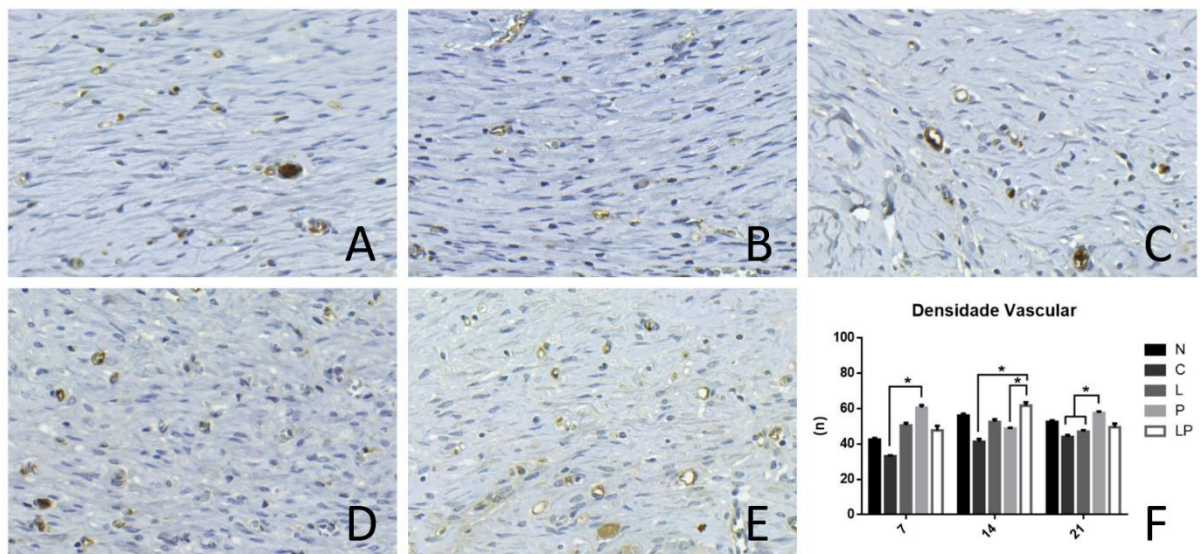


Figura 11. Expressão imunoistoquímica de CD105 dos grupos N, C, L, P e LP (A–E, respectivamente) ao 14^o dia de experimento (Aumento: 40x). O gráfico (F) representa a média \pm desvio padrão do total de vasos neoformados nos grupos ao longo do experimento, comparados por teste de Kruskal Wallis e comparados individualmente com teste de Mann-Whitney; * $p < 0,05$.

6. DISCUSSÃO

O tempo de fechamento da ferida, analisado pelo índice de contração é um dos parâmetros iniciais de avaliação da ferida. Na prática clínica, a comparação dos valores mensurados nos indica preliminarmente o sucesso ou insucesso da terapia, bem como o tempo que o paciente permanece exposto a uma série de complicações como infecções, dificuldades de cicatrização, perda de fluídos, entre outros (MAGALHÃES et al, 2015).

No presente estudo, observou-se um fechamento mais rápido da ferida nos grupos tratados (L, P e LP), apresentando uma taxa de fechamento da ferida ainda mais elevado no grupo LP em relação aos demais grupos, estando todas as feridas desse grupo fechadas ao 14^o dia, valor que revela uma diminuição de em média 30% no tempo de fechamento total da ferida. Apesar da taxa de contração ser um parâmetro básico e sempre utilizado na avaliação de feridas cutâneas (DE LOURA SANTANA et. al., 2015; HAN et. al, 2019), o entendimento de como os tecidos se comportam com o uso de determinadas terapias durante o reparo tecidual nos permite entender quais os benefícios e malefícios das escolhas desses tratamentos.

Os usos isolados de própolis e da laserterapia de baixa intensidade são bastante disseminados na literatura, no entanto esse é o primeiro estudo de associação da irradiação via (LBI) em doses fracionadas de 4J/cm² com a administração da própolis verde em feridas cutâneas de animais com DM induzida. Dada a evidência de que o LBI e a Própolis podem agir melhorando a síntese de colágeno tanto na cicatrização normal quanto no caso do DM, este estudo tentou identificar um possível benefício do LBI associado a Própolis na síntese e nos níveis de organização do colágeno.

No nosso estudo, observou-se que a aplicação de LBI associada a própolis foi capaz de aumentar a expressão de colágeno total ao final do experimento (dia 21) tanto ao ser avaliado por birrefringência das fibras como por microscopia de fluorescência, no entanto, não foi possível identificar uma superioridade na associação do LBI com a própolis em relação aos tratamentos realizados isoladamente (laser ou própolis). Percebeu-se uma associação desses achados com uma modulação na densidade de fibras do colágeno, onde as proporções de fibras espessas em relação às fibras finas estão mais elevadas nos grupos tratados (L, P e LP), enquanto no grupo C essa variação foi menor.

Os resultados do presente estudo corroboram com os achados de Da Silva et al. (2013), em um experimento utilizando laserterapia em ratos diabéticos, onde a utilização de 4J/cm² promoveu um aumento da porcentagem de colágeno nos animais tratados. Os autores hipotetizaram que o aumento significativo na deposição de colágeno em resposta à laserterapia é devido à indução da proliferação celular ou síntese e secreção proteica, podendo acontecer os dois mecanismos concomitantemente.

A utilização da própolis tem demonstrado resultados positivos na síntese de colágeno. No estudo de Hozzein, *et al.*, (2015), a utilização da própolis foi capaz de aumentar a quantidade de hidroxiprolina (principal constituinte do colágeno tipo I), acelerando a cicatrização e o fechamento da ferida. Os autores destacam a importância do reestabelecimento da deposição do colágeno, reforçando que a própolis pode restaurar a composição e a qualidade da matriz extracelular, prevenindo assim uma cicatrização tardia, principalmente pela substituição do colágeno tipo III por colágeno tipo I.

Embora seja difícil analisar precisamente as fibras de colágeno I e III, visando uma separação total das fibras através de métodos birrefringentes (Rich e Whittake, 2005), uma certa quantidade dessas fibras estão relacionadas com a espessura, devido o colágeno III (imaturo) ser mais delgado e o colágeno I (maduro) possuir fibras mais espessas (LATTOUF, *et al.*, 2014).

No nosso estudo, não foi observada diferença estatística em relação à expressão total de colágeno entre os grupos tratados (L, P e LP), no entanto ao ser avaliado a porcentagem de fibras finas, observou-se um aumento dessas fibras nos animais tratados apenas com laser, confirmando os achados de Da Silva, *et al.*, (2013). A própolis potencialmente trouxe um efeito benéfico pela substituição de colágeno tipo III por colágeno tipo I conforme relatado por Hozzein, *et al.*, (2015), sendo mais visível esse efeito no grupo onde laser e própolis foram aplicados associados.

Não somente o tipo de colágeno é importante, como também a disposição dessas fibras no tecido cicatricial. Outro achado importante do presente estudo foi uma disposição mais aleatória do colágeno, avaliado pelo índice de orientação do colágeno, tendo sido identificada uma organização aleatória das fibras nos grupos tratados com laser (L e LP), sem diferença estatística entre ambos. Estes resultados se assemelham aos índices da pele sadia, como descrito por Verhaegen, *et al.*, (2009),

em estudo com biópsias de feridas humanas crônicas, o índice de orientação do colágeno se manteve mais aleatório na pele normal do que nas cicatrizes normotróficas e hipertróficas (não tratadas), apresentando uma configuração paralela, que se associa à contratura dessas das feridas. Nossos resultados demonstram uma não superioridade da própolis com os grupos tratados com laser após o 14^o dia, apresentando ainda um índice de orientação menor, portanto mais aleatório do que nas cicatrizes do estudo de Verhaegen, *et al.*, (2009), demonstrando a relevância dos nossos achados devido as feridas deste estudo ter média de 5,3 anos após as biópsias, o que nos leva a inferir que os tratamentos propostos no nosso estudo anteciparam a homeostase do tecido lesionado.

O método utilizado no nosso estudo para medir a organização do colágeno descrito por Zuijlen, *et al.*, (2002), possibilita também avaliar a distância entre os feixes de colágeno, outro parâmetro que se apresenta diferente na pele normal e em tipos diferentes de ferida (normotróficas, hipertróficas e queloides) sendo essa uma limitação do nosso estudo, uma vez que Zuijlen, *et al.*, (2002) utilizaram microscopia confocal para a obtenção de cortes paralelos à epiderme neste outro tipo de avaliação, sendo inviável a realização por microtomia.

À medida que o papel do colágeno na cicatrização e homeostase do tecido se torna mais aparente, novos métodos são necessários para detectar mudanças na organização da fibra de colágeno além do conteúdo bruto. No estudo de Vogel, *et al.*, (2015) o método desenvolvido a partir de imagens obtidas por microscopia de fluorescência permite quantificar de forma automatizada o conteúdo total de colágeno em tecido cardíaco, podendo ser adaptado para outros tecidos.

No presente trabalho, buscou-se avaliar se a análise do conteúdo de colágeno por microscopia de fluorescência possuía uma correlação com o método de análise sob luz polarizada por birrefringência do colágeno, que é um dos métodos mais empregados na literatura (RICH e WITHAKER, 2005; LATTOUF *et al.*, 2014), sendo este estudo o primeiro a investigar a correlação entre os dois métodos de microscopia (birrefringência e fluorescência) no tecido cutâneo e em feridas. Observou-se uma forte correlação entre os métodos na avaliação do tecido sadio, adjacente a lesão. Quando avaliado os valores do leito da ferida, foi encontrado uma correlação moderada, com uma maior área de colágeno nos espécimes avaliados por fluorescência. Estes resultados corroboram os achados de Wegner, *et al.*, (2017) indicando uma maior sensibilidade do colágeno com a microscopia de fluorescência,

que relata ainda a possibilidade de obter-se um resultado subestimado ao avaliar o conteúdo de colágeno através de microscopia de luz polarizada, dependendo do posicionamento da lâmina/amostra e da rotação da lente polarizada, causando uma redução no brilho e contraste da digitalização. No método proposto por Vogel, *et al.*, (2015) é realizada uma subtração da área celular em relação ao colágeno sem ser considerado os espaços vazios. É um processo de fácil execução utilizando softwares de fácil aquisição e manuseio com etapas semi-automatizadas, o que permite a avaliação de um número grande de campos em um período de tempo reduzido. A avaliação através de microscopia de fluorescência se limita a avaliar o conteúdo total de colágeno, sendo escassos estudos que avaliam a morfologia das fibras de colágeno sobre microscopia de fluorescência. Uma perspectiva futura seria avaliar se esse método descrito por Zuijlen, *et al.*, (2002) para avaliar quantitativamente a organização do colágeno também pode ser aplicado a imagens obtidas a partir de microscopia de fluorescência.

Dada a complexidade dos eventos envolvidos na cicatrização, a busca por elementos que interaja com uma quantidade maior de eventos tem se tornado fundamental para uma modulação integral no processo de cicatrização. Diversos autores evidenciam que os mastócitos possam participar de uma forma ampla na cicatrização participando da resposta imune, e das fases inflamatória e proliferativa, assim como na transição entre essas duas etapas (DE CASTRO *et al.*, 2014; TELLECHEA *et al.*, 2016).

No nosso estudo, observou-se uma quantidade reduzida de MCT1, MCT2 e MCT3 no grupo L em relação ao grupo C, havendo também uma tendência na diminuição do grupo LP em comparação aos grupos de tratamento isolado (L e P). A aplicação do laser isoladamente também foi capaz de reduzir a quantidade MCT1 e MCT2 até o 14^o dia. Esses achados sustentam também as comparações feitas da quantidade total de mastócitos, onde a mesma tendência de benefício com a associação de laser e própolis pôde ser observado. Confirmando os achados de Bagheri, *et al.*, (2018), que mostrou que a laserterapia foi capaz de diminuir a quantidade de mastócitos em feridas de ratos diabéticos, e do estudo de Barroso, *et al.*, (2011) que evidenciou a diminuição da quantidade dessas células em cicatrização de feridas com a aplicação da própolis, nossos dados sugerem que houve um benefício da associação do laser com a própolis, sendo observado uma tendência na

redução além dos valores dos grupos L e P. No 21º dia, essas diferenças foram evidenciadas estatisticamente.

Na fase proliferativa do reparo tecidual ocorre a maior taxa de fechamento da ferida devido à grande formação de tecido fibroso e angiogênese. Essa fase é fortemente modulada pelo TGF- β , que induz a proliferação de fibroblastos e sua diferenciação em miofibroblastos, que podem ser estimulados por irradiação a laser, se aplicada com uma dosagem adequada (Darby, *et al.*, 2015). Por disponibilizar uma definição de parâmetros muito variáveis, estudos recentes buscam uma dosagem ou forma de aplicação ótima do laser.

De Loura Santana, *et al.*, (2015) demonstraram um aumento na quantidade de miofibroblastos utilizando laserterapia com comprimento de onda de 660nm em aplicação única ou fracionada ao longo dos dias, apesar das duas estratégias de aplicação mostrarem um aumento na quantidade de miofibroblastos em relação ao grupo controle a partir do 15º dia. De Almeida, *et al.*, (2013) comprovaram que a utilização de filmes à base de colágenos contendo extrato de própolis aumenta a taxa de contração da ferida por uma colagenização mais rápida, estando diretamente ligada ao aumento da quantidade de miofibroblastos. Estes achados contribuíram para uma cicatriz final menor e menos retraída, sugerindo uma diminuição nos riscos de desenvolvimento de cicatrizes hipertróficas ou queloides.

Nossos resultados indicaram um aumento na quantidade de miofibroblastos em resposta ao tratamento com laser e própolis e que uma possível adição dos efeitos pode ser vista em maior ou menor grau ao longo do experimento, sendo mais evidente no 14º dia. Além desses achados, o fechamento mais rápido da ferida, promovido diretamente pelos miofibroblastos, é de fundamental importância para pacientes diabéticos com ulcerações cutâneas (DE LOURA SANTANA *et al.*, 2015).

A angiogênese insuficiente desempenha um papel significativo na patogênese da cicatrização de feridas diabéticas, em decorrência dos seus efeitos micro e macrovascular, evidenciando uma diminuição da vascularização e da densidade capilar (DINH e VEVES, 2005). Foi demonstrado anteriormente que o laser em comprimento de onda de 635 nm com dosagens entre 4-8 J/cm² aumenta a proliferação de células endoteliais com uma diminuição correspondente na concentração do VEGF, sugerindo a participação deste fator no processo de reparo (SZYMANSKA *et al.*, 2013). A Endoglina (ENG ou CD105) é uma glicoproteína transmembrana essencial para angiogênese e desenvolvimento vascular, que é

predominantemente expressa em células endoteliais vasculares (PARK et. al., 2013). A utilização do CD105 como marcador de angiogênese processos imunológicos (VERÉB et. al., 2017), tumorigênese (GOLDIS et. al., 2015; MIYATA et. al., 2013; KAWACHI, 2011) e tratamentos dermatológicos (MEYER et. al., 2017).

Nossos resultados encontrados a partir da análise da expressão do CD105 revelaram uma manutenção na superioridade da média de densidade vascular dos grupos tratados. Entretanto, percebe-se melhores resultados com aplicação da própolis ao 21º dia e da associação desse ao laser no 14º dia. O grupo C se comportou de forma a aumentar progressivamente a cada intervalo experimental estudado, o que indica uma desregulação na neoangiogênese proveniente do DM, cronificando o processo de cicatrização como sugerem diversos autores (SORG et. al., 2017; EMING et. al., 2014; HESKETH et. al., 2017). Assim, os dados sugerem que a utilização de laser e própolis isolados ou combinados, se apresentam como alternativas viáveis para a modulação do reparo tecidual, modulando a angiogênese em feridas crônicas, como no caso de feridas de indivíduos com diabetes.

7. CONCLUSÃO

A análise geral dos dados obtidos permite concluir que a associação de laser e própolis em feridas cirúrgicas de segunda intenção em ratos com diabetes induzida por estreptozotocina promoveu um reparo mais rápido das feridas por menor degranulação de mastócitos, aumento na densidade de vasos e miofibroblastos e maior produção e organização do colágeno. Além disso ficou evidente que a microscopia de fluorescência é mais sensível para avaliar o conteúdo total de colágeno do que microscopia de luz polarizada, demonstrando ser mais adequada para quantificar espessuras das fibras em feridas cutâneas de ratos diabéticos. Por fim, novos estudos são necessários para determinar precisamente os mecanismos celulares e moleculares que consolidem esses achados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALAVI A, SIBBALD RG, MAYER D, GOODMAN L, BOTROS M, ARMSTRONG DG, WOO K, BOENI T, AYELLO EA, KIRSNER RS. Diabetic foot ulcers: Part I. pathophysiology and prevention. **J Am Acad Dermatol**. 2014 Jan;70(1):1.e1-18.

AL-AWAR A, KUPAI K, VESZELKA M, SZŰCS G, ATTIEH Z, MURLASITS Z, TÖRÖK S, PÓSA A, VARGA C. Experimental Diabetes Mellitus in Different Animal Models. **J Diabetes Res**. 2016;2016:9051426.

AMINIMOGHADAMFAROUJ N, NEMATOLLAHI A. Propolis Diterpenes as a Remarkable Bio-Source for Drug Discovery Development: A Review. **Int J Mol Sci**. 2017 Jun 17;18(6): pii: E1290..

ANDRADE FSSD, CLARK RMO, FERREIRA ML. Effects of low-level laser therapy on wound healing. **Rev Col Bras Cir**. 2014 Mar-Apr;41(2):129-33.

BAGHERI M, AMINI A, ABDOLLAHIFAR MA, GHOREISHI SK, PIRYAEI A, POURIRAN R, CHIEN S, DADRAS S, REZAEI F, BAYAT M. Effects of Photobiomodulation on Degranulation and Number of Mast Cells and Wound Strength in Skin Wound Healing of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. **Photomed Laser Surg**. 2018 Aug;36(8):415-423.

BARROSO PR, LOPES-ROCHA R, PEREIRA EM, MARINHO SA, DE MIRANDA JL, LIMA NL, VERLI FD. Effect of propolis on mast cells in wound healing. **Inflammopharmacology**. 2012 Oct;20(5):289-94..

BUSNARDO VL, BIONDO-SIMÕES MLP. Effects of low-level helium-neon laser on induced wound healing in rats. **Braz J Phys Ther**. 2010;14(1):45-51..

CARDOSO L, USERO R, CATANI SMM, BARBO MLP, ESPOSITO AR, DUEK EAR. Implante de membranas de PLLA/Trietil-Citrato como alternativa no tratamento de feridas cutâneas. **Polímeros** 2013;23(6):798-806.

CHUNG H, DAI T, SHARMA SK, HUANG YY, CARROLL JD, HAMBLIN MR. The nuts and bolts of low-level laser (light) therapy. **Ann Biomed Eng**. 2012 Feb;40(2):516-33..

CHILDS DR, MURTHY AS. Overview of Wound Healing and Management. **Surg Clin North Am.** 2017;97(1):189-207.

DA SILVA JP, DA SILVA MA, ALMEIDA AP, LOMBARDI JUNIOR I, MATOS AP. Laser therapy in the tissue repair process: a literature review. **Photomed Laser Surg.** 2010 Feb;28(1):17-21.

DA SILVA A, LEAL-JUNIOR EC, ALVES AC, RAMBO CS, DOS SANTOS SA, VIEIRA RP, DE CARVALHO PDE T. Wound-healing effects of low-level laser therapy in diabetic rats involve the modulation of MMP-2 and MMP-9 and the redistribution of collagen types I and III. **J Cosmet Laser Ther.** 2013 Aug;15(4):210-6.

DARBY IA, LAVERDET B, BONTÉ F, DESMOULIÈRE A. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. **Clin Cosmet Investig Dermatol.** 2014;7:301–11.

DARBY IA, ZAKUAN N, BILLET F, DESMOULIÈRE A. The myofibroblast, a key cell in normal and pathological tissue repair. **Cell Mol Life Sci.** 2016 Mar;73(6):1145-57.

DE ALMEIDA EB, CORDEIRO CARDOSO J, KARLA DE LIMA A, DE OLIVEIRA NL, DE PONTES-FILHO NT, OLIVEIRA LIMA S, LEAL SOUZA IC, DE ALBUQUERQUE-JÚNIOR RL. The incorporation of Brazilian propolis into collagen-based dressing films improves dermal burn healing. **J Ethnopharmacol.** 2013 May 20;147(2):419-25.

DE CASTRO IC, ROCHA CA, GOMES HENRIQUES AC, CAVALCANTI DE SOUSA AP, LISBOA MV, SOTERO DDA R, PINHEIRO AL, CURY PR, SANTOS JN. Do laser and led phototherapies influence mast cells and myofibroblasts to produce collagen? **Lasers Med Sci.** 2014 Jul;29(4):1405-10.

DE FREITAS LF, HAMBLIN MR. Proposed Mechanisms of Photobiomodulation or Low-Level Light Therapy. **IEEE J Sel Top Quantum Electron.** 2016 May-Jun;22(3). pii: 7000417.

DE GROOT AC. Propolis: a review of properties, applications, chemical composition, contact allergy, and other adverse effects. **Dermatitis.** 2013 Nov-Dec;24(6):263-82

DE LOURA SANTANA C, SILVA DDE F, DEANA AM, PRATES RA, SOUZA AP, GOMES MT, DE AZEVEDO SAMPAIO BP, SHIBUYA JF, BUSSADORI SK,

MESQUITA-FERRARI RA, FERNANDES KP, FRANÇA CM. Tissue responses to postoperative laser therapy in diabetic rats submitted to excisional wounds. **PLoS One**. 2015 Apr 24;10(4):e0122042..

DE SOUSA NT, GUIRRO RR, SANTANA HF, SILVA CC. In vitro analysis of bacterial morphology by atomic force microscopy of low level laser therapy 660, 830 and 904 nm. **Photomed Laser Surg**. 2012 May;30(5):281-5.

DINH T, VEVES A. Microcirculation of the diabetic foot. **Curr Pharm Des**. 2005;11(18):2301-9.

DRISKELL RR, LICHTENBERGER BM, HOSTE E, KRETZSCHMAR K, SIMONS BD, CHARALAMBOUS M, FERRON SR, HERAULT Y, PAVLOVIC G, FERGUSON-SMITH AC, WATT FM. Distinct fibroblast lineages determine dermal architecture in skin development and repair. **Nature**. 2013 Dec 12;504(7479):277-281.

FERNANDES JÚNIOR A, LOPES MMR, COLOMBARI V, MONTEIRO ACM, VIEIRA EP. Atividade antimicrobiana de própolis de *Apis mellifera* obtidas em três regiões do Brasil. **Ciênc Rural**. 2006;36(1):294-7.

EMING SA, MARTIN P, TOMIC-CANIC M. Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation. **Sci Transl Med**. 2014 Dec 3;6(265):265sr6.

GONZALEZ AC, COSTA TF, ANDRADE ZA, MEDRADO AR. Wound healing - A literature review. **An Bras Dermatol**. 2016 Sep-Oct;91(5):614-620.

GALIANO RD, TEPPER OM, PELO CR, BHATT KA, CALLAGHAN M, BASTIDAS N, BUNTING S, STEINMETZ HG, GURTNER GC. Topical vascular endothelial growth factor accelerates diabetic wound healing through increased angiogenesis and by mobilizing and recruiting bone marrow-derived cells. **Am J Pathol**. 2004 Jun;164(6):1935-47..

GURTNER GC, WERNER S, BARRANDON Y, LONGAKER MT. Wound repair and regeneration. **Nature**. 2008 May 15;453(7193):314-21.

GUO S, DIPIETRO LA. Factors affecting wound healing. **J Dent Res**. 2010 Mar;89(3):219-29.

HAN Y, SUN T, HAN Y, LIN L, LIU C, LIU J, YAN G, TAO R. Human umbilical cord mesenchymal stem cells implantation accelerates cutaneous wound healing in diabetic rats via the Wnt signaling pathway. **Eur J Med Res**. 2019 Feb 8;24(1):10.

HASHEMI SA, MADANI SA, ABEDIANKENARI S. The Review on Properties of Aloe Vera in Healing of Cutaneous Wounds. **Biomed Res Int**. 2015;2015:714216.

HENSHAW FR, BOLTON T, NUBE V, HOOD A, VELDHOEN D, PFRUNDER L, MCKEW GL, MACLEOD C, MCLENNAN SV, TWIGG SM. Topical application of the bee hive protectant propolis is well tolerated and improves human diabetic foot ulcer healing in a prospective feasibility study. **J Diabetes Complications**. 2014 Nov-Dec;28(6):850-7.

HESKETH M, SAHIN KB, WEST ZE, MURRAY RZ. Macrophage phenotypes regulate scar formation and chronic wound healing. **Int J Mol Sci**. 2017 Jul 17;18(7). pii: E1545.

HOZZEIN WN, BADR G, AL GHAMDI AA, SAYED A, AL-WAILI NS, GARRAUD O. 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. **Cell Physiol Biochem**. 2015;37(3):940-54..

HUANG YY, SHARMA SK, CARROLL J, HAMBLIN MRL., Biphasic dose response in low level light therapy—an update. **Dose Response**. 2011;9(4):602-18.

HUSSNI CA, GROH TM, ALVES ALG, CROCCI AJ, DE MELLO NICOLETTI JL, WATANABE MJ. Efeitos da fenilbutazona na cicatrização de feridas cutâneas experimentais em equinos. **Braz J Vet Res Anim Sci**. 2010;47(4):262-7..

JACOB A, PAROLIA A, PAU A, DAVAMANI AMALRAJ F. The effects of Malaysian propolis and Brazilian red propolis on connective tissue fibroblasts in the wound healing process. **BMC Complement Altern Med**. 2015 Aug 25;15:294.

KASPER DL, FAUCI AS, HAUSER SL, LONGO DL, JAMESON L, LOSCALZO J. **Manual de Medicina de Harrison**. McGraw Hill Brasil, 2017.

KATAOKA M, KAWAMURO Y, SHIRAKI N, MIKI R, SAKANO D, YOSHIDA T, YASUKAWA T, KUME K, KUME S. Recovery from diabetes in neonatal mice after a

low-dose streptozotocin treatment. **Biochem Biophys Res Commun.** 2013 Jan 18;430(3):1103-8.

KAWACHI N. A comparative histopathological and immunohistochemically study of capillary hemangioma, pyogenic granuloma and cavernous hemangioma in the oral region: with special reference to vascular proliferation factors. **Int J Oral-Med Sci.** 2011;9(3):241-51..

KILÍK R, LAKYOVÁ L, SABO J, KRUZLIAK P, LACJAKOVÁ K, VASILENKO T, VIDOVÁ M, LONGAUER F, RADOŇAK J. Effect of equal daily doses achieved by different power densities of low-level laser therapy at 635 nm on open skin wound healing in normal and diabetic rats. **Biomed Res Int.** 2014;2014:269253..

KUFFLER DP. Photobiomodulation in promoting wound healing: a review. **Regen Med.** 2016 Jan;11(1):107-22.

LATTOUF R, YOUNES R, LUTOMSKI D, NAAMAN N, GODEAU G, SENNI K, CHANGOTADE S. Picrosirius red staining: a useful tool to appraise collagen networks in normal and pathological tissues. **J Histochem Cytochem.** 2014 Oct;62(10):751-8.

LINS RD, DANTAS EM, LUCENA KC, CATÃO MH, GRANVILLE-GARCIA AF, CARVALHO NETO LG. Biostimulation effects of low-power laser in the repair process. **An Bras Dermatol.** 2010 Nov-Dec;85(6):849-55..

MCLAUGHLIN E, SZAGON I. Opioid Antagonists Enhance Diabetic Wound Closure: A New Therapy. **Transl Med** (Sunnyvale). 2014 November 4:142.

MADRIGAL-SANTILLÁN E, MADRIGAL-BUJAI DAR E, ÁLVAREZ-GONZÁLEZ I, SUMAYA-MARTÍNEZ MT, GUTIÉRREZ-SALINAS J, BAUTISTA M, MORALES-GONZÁLEZ Á, GARCÍA-LUNA Y GONZÁLEZ-RUBIO M, AGUILAR-FAISAL JL, MORALES-GONZÁLEZ JA. Review of natural products with hepatoprotective effects. **World J Gastroenterol.** 2014 Oct 28;20(40):14787-804.

MAGALHÃES, M.A.B. et al. Closure of large wounds using rubber bands in rabbits. **Rev. Col. Bras. Cir.**, Rio de Janeiro, v. 42, n. 1, p. 56-61, 2015.

MAKRANTONAKI E, JIANG D, HOSSINI AM, NIKOLAKIS G, WLASCHEK M, SCHARFFETTER-KOCHANNEK K, ZOUBOULIS CC. Diabetes mellitus and the skin. **Rev Endocr Metab Disord**. 2016 Sep;17(3):269-282.

MARTINOTTI S, RANZATO E. Propolis: a new frontier for wound healing? **Burns Trauma**. 2015 Jul 22;3:9.

MCLENNAN SV, BONNER J, MILNE S, LO L, CHARLTON A, KURUP S, JIA J, YUE DK, TWIGG SM. The anti-inflammatory agent Propolis improves wound healing in a rodent model of experimental diabetes. **Wound Repair Regen**. 2008 Sep-Oct;16(5):706-13.

MEDRADO AP, SOARES AP, SANTOS ET, REIS SR, ANDRADE ZA. Influence of laser photobiomodulation upon connective tissue remodeling during wound healing. **J Photochem Photobiol B**. 2008 Sep 18;92(3):144-52.

MEYER PF, DE OLIVEIRA P, SILVA FKBA, DA COSTA ACS, PEREIRA CRA, CASENAVE S, VALENTIM SILVA RM, ARAÚJO-NETO LG, SANTOS-FILHO SD, AIZAMAQUE E, ARAÚJO HG, BERNARDO-FILHO M, CARVALHO MGF, SOARES CD. Radiofrequency treatment induces fibroblast growth factor 2 expression and subsequently promotes neocollagenesis and neoangiogenesis in the skin tissue. **Lasers Med Sci**. 2017 Nov;32(8):1727-1736.

MIRZA R, KOH TJ. Dysregulation of monocyte/macrophage phenotype in wounds of diabetic mice. **Cytokine**. 2011 Nov;56(2):256-64.

MIYATA Y, SAGARA Y, WATANABE S, ASAI A, MATSUO T, OHBA K, HAYASHI T, SAKAI H. CD105 is a more appropriate marker for evaluating angiogenesis in urothelial cancer of the upper urinary tract than CD31 or CD34. **Virchows Arch**. 2013 Nov;463(5):673-9..

NOOR S, ZUBAIR M, AHMAD J. Diabetic foot ulcer—A review on pathophysiology, classification and microbial etiology. **Diabetes Metab Syndr**. 2015 Jul-Sep;9(3):192-9.

NOVAK ML, KOH TJ. Macrophage phenotypes during tissue repair. **J Leukoc Biol**. 2013 Jun;93(6):875-81.

OCON CA, DOS SANTOS SA, CAIRES JR, DE OLIVEIRA MFD, SERRA AJ, LEAL-JUNIOR EC, DE CARVALHO PTC. Effects and parameters of the photobiomodulation in experimental models of third-degree burn: systematic review. **Lasers Med Sci.** 2019 Apr;34(3):637-648.

OKONKWO UA, DIPIETRO LA. Diabetes and wound angiogenesis. **Int J Mol Sci.** 2017 Jul 3;18(7).

PARK JW, HWANG SR, YOON IS. Advanced Growth Factor Delivery Systems in Wound Management and Skin Regeneration. **Molecules.** 2017 Jul 27;22(8).

PARK S, DIMAIO TA, LIU W, WANG S, SORENSON CM, SHEIBANI N. Endoglin regulates the activation and quiescence of endothelium by participating in canonical and non-canonical TGF- β signaling pathways. **J Cell Sci.** 2013 Mar 15;126(Pt 6):1392-405.

PEREIRA RF, BÁRTOLO PJ. Traditional Therapies for Skin Wound Healing. **Adv Wound Care** (New Rochelle). 2016 May 1;5(5):208-229.

PROMPERS L, SCHAPER N, APELQVIST J, EDMONDS M, JUDE E, MAURICIO D, UCCIOLI L, URBANCIC V, BAKKER K, HOLSTEIN P, JIRKOVSKA A, PIAGGESI A, RAGNARSON-TENNVALL G, REIKE H, SPRAUL M, VAN ACKER K, VAN BAAL J, VAN MERODE F, FERREIRA I, HUIJBERTS M. Prediction of outcome in individuals with diabetic foot ulcers: focus on the differences between individuals with and without peripheral arterial disease. The EURODIALE Study. **Diabetologia.** 2008 May;51(5):747-55.

RAM M, SINGH V, KUMAWAT S, KANT V, TANDAN SK, KUMAR D. Bilirubin modulated cytokines, growth factors and angiogenesis to improve cutaneous wound healing process in diabetic rats. **Int Immunopharmacol.** 2016 Jan;30:137-149.

RAJA, SIVAMANI K, GARCIA MS, ISSEROFF RR. Wound re-epithelialization: modulating keratinocyte migration in wound healing. **Front Biosci.** 2007 May 1;12:2849-68.

RAKOCEVIC J, ORLIC D, MITROVIC-AJTIC O, TOMASEVIC M, DOBRIC M, ZLATIC N, MILASINOVIC D, STANKOVIC G, OSTOJIĆ M, LABUDOVIC-BOROVIC M.

Endothelial cell markers from clinician's perspective. **Exp Mol Pathol.** 2017 Apr;102(2):303-313.

RATHNAKAR B, RAO BS, PRABHU V, CHANDRA S, RAI S, RAO AC, SHARMA M, GUPTA PK, MAHATO KK. Photo-biomodulatory response of low-power laser irradiation on burn tissue repair in mice. **Lasers Med Sci.** 2016 Dec;31(9):1741-1750.

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

ROCHA JÚNIOR AM, OLIVEIRA RGD, FARIAS RE, ANDRADE LCFD, AARESTRUP FM. Modulation of fibroblast proliferation and inflammatory response by low-intensity laser therapy in tissue repair process. **An Bras Dermat.** 2006;81(2):150-6.

SANTOS PPA, NONAKA CFW, FREITAS RA, PEREIRA PINTO L, SOUZA LB. Immunohistochemical analysis of myofibroblasts, TGF- β 1, and IFN- γ in epithelial odontogenic lesions. **J Oral Pathol Med.** 2017 May;46(5):365-370.

SEITZ O, SCHÜRMAN C, HERMES N, MÜLLER E, PFEILSCHIFTER J, FRANK S, GOREN I. Wound healing in mice with high-fat diet- or ob gene-induced diabetes-obesity syndromes: a comparative study. **Exp Diabetes Res.** 2010;2010:476969.

SFORCIN JM. Biological Properties and Therapeutic Applications of Propolis. **Phytother Res.** 2016 Jun;30(6):894-905.

SINDRILARU A, PETERS T, WIESCHALKA S, BAICAN C, BAICAN A, PETER H, WEISS JM. An unrestrained proinflammatory M1 macrophage population induced by iron impairs wound healing in humans and mice. **J Clin Invest.** 2011;121(3):985-97.

SORG H, TILKORN DJ, HAGER S, HAUSER J, MIRASTSCHIJSKI U. Skin Wound Healing: An Update on the Current Knowledge and Concepts. **Eur Surg Res.** 2017;58(1-2):81-94.

SZYMANSKA J, GORALCZYK K, KLAWE JJ, LUKOWICZ M, MICHALSKA M, GORALCZYK B, ZALEWSKI P, NEWTON JL, GRYKO L, ZAJAC A, ROSC D. Phototherapy with low-level laser influences the proliferation of endothelial cells and

vascular endothelial growth factor and transforming growth factor-beta secretion. **J Physiol Pharmacol**. 2013 Jun;64(3):387-91.

TAZIMA MFGS, VICENTE YAMVA, MORIYA, T. Biologia da ferida e cicatrização. **Medicina**. 2008.41(3):259-64.

TELLECHEA A, LEAL EC, KAFANAS A, AUSTER ME, KUCHIBHOTLA S, OSTROVSKY Y, TECILAZICH F, BALZIS D, ZHENG Y, CARVALHO E, ZABOLOTNY JM, WENG Z, PETRA A, PATEL A, PANAGIOTIDOU S, PRADHAN-NABZDYK L, THEOHARIDES TC, VEVES A. Mast Cells Regulate Wound Healing in Diabetes. **Diabetes**. 2016 Jul;65(7):2006-19..

THEOHARIDES TC, SISMANOPOULOS N, DELIVANIS DA, ZHANG B, HATZIAGELAKI EE, KALOGEROMITROS D. Mast cells squeeze the heart and stretch the gird: their role in atherosclerosis and obesity. **Trends Pharmacol Sci**. 2011 Sep;32(9):534-42.

TRESVENZOL, LMF, PARENTE, LML, LINO JÚNIOR, RS, FIUZA, TS, BARA, MTF, CUNHA, LC, PUCCI, LL, MIGUEL, MP, PAULA, JR. Avaliação da toxicidade aguda e da atividade cicatrizante dos extratos etanólicos das folhas e raízes da Memora nodosa (Silva Manso) Miers (Bignoniaceae). **Rev Bras PI Med**. 2013;15(3): 423-30.

VERÉB Z, PÓLISKA S, ALBERT R, OLSAD OK, BORATKÓ A, CSORTOS C, MOE MC, FACSKÓ A, PETROVSKI G. Role of Human Corneal Stroma-Derived Mesenchymal-Like Stem Cells in Corneal Immunity and Wound Healing. **Sci Rep**. 2016 May 19;6:26227.

VERHAEGEN PD, VAN ZUIJLEN PP, PENNINGNS NM, VAN MARLE J, NIESSEN FB, VAN DER HORST CM, MIDDELKOOP E. Differences in collagen architecture between keloid, hypertrophic scar, normotrophic scar, and normal skin: An objective histopathological analysis. **Wound Repair Regen**. 2009 Sep-Oct;17(5):649-56.

VOGEL B, SIEBERT H, HOFMANN U, FRANTZ S. Determination of collagen content within picrosirius red stained paraffin-embedded tissue sections using fluorescence microscopy. **MethodsX**. 2015 Feb 21;2:124-34..

WEGNER KA, KEIKHOSRAVI A, ELICEIRI KW, VEZINA CM. Fluorescence of Picrosirius Red Multiplexed With Immunohistochemistry for the Quantitative Assessment of Collagen in Tissue Sections. **J Histochem Cytochem.** 2017 Aug;65(8):479-490.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Report on Diabetes.** Geneva, 2016. Disponível em <http://www.who.int/diabetes/global-report/en/>. Acessado em 12 de junho de 2017.

XUE M, JACKSON CJ. Extracellular Matrix Reorganization During Wound Healing and Its Impact on Abnormal Scarring. **Adv Wound Care** (New Rochelle). 2015 Mar 1;4(3):119-136.

ZHANG Z, CAO G, SHA L, WANG D, LIU M. The Efficacy of Sodium Aescinate on Cutaneous Wound Healing in Diabetic Rats. **Inflammation.** 2015 Oct;38(5):1942-8.

ZHU W, CHEN M, SHOU Q, LI Y, HU F. Biological activities of chinese propolis and brazilian propolis on streptozotocin-induced type 1 diabetes mellitus in rats. **Evid Based Complement Alternat Med.** 2011;2011:468529.

van ZUIJLEN PP, LAMME EN, van GALEN MJ, van MARLE J, KREIS RW, MIDDELKOOP E. Long-term results of a clinical trial on dermal substitution. A light microscopy and Fourier analysis based evaluation. **Burns.** 2002 Mar;28(2):151-60.

ANEXO I



Universidade Federal do Rio Grande do Norte
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

PROTOCOLO N.º 036/2015

Professor/Pesquisador: *NAISANDRA BEZERRA DA SILVA*

Natal (RN), 02 de setembro 2015.

Certificamos que o projeto intitulado "**Efeito da associação de laserterapia e própolis na cicatrização de feridas em ratos diabéticos**", protocolo 036/2015, sob a responsabilidade de NAISANDRA BEZERRA DA SILVA, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n.º 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n.º 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS da Universidade Federal do Rio Grande do Norte – CEUA/UFRN, em reunião de **02 de setembro de 2015**.

Vigência do Projeto	OUTUBRO 2017
Número de Animais	90
Espécie/Linhagem	Ratos / Wistar
Peso/Idade	300-350g / 16 semanas
Sexo	Machos
Origem	Biotério do Centro de Ciências da Saúde - UFRN

Informamos ainda que, segundo o Cap. 2, Art. 13 do Regimento, é função do professor/pesquisador responsável pelo projeto a elaboração de relatório de acompanhamento que deverá ser entregue tão logo a pesquisa for concluída.


 Josy Carolina Covan Pontes
 Coordenadora da CEUA