CAPÍTULO 05

EFEITOS DA TERAPIA LED ASSOCIADA A *H. DRASTICUS* NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS EM RATOS WISTAR

**Marinalva Ferreira Silva¹, Diego Gomes da Silva², Daniel da Silva Gomes³
Lorena Valeria da Cruz Lima Dorneles⁴, Carla de Jesus dos Santos Vieira⁵, Maiza
Vieira Duarte Ribeiro⁶, Danielle de Brito Rodrigues⁷, Rosalice Campos de Sousa⁸,
Amália Ribeiro Gonçalves de Vasconcelos⁹, Emanuel Macedo Costa¹⁰, Suelen Gomes
da Silva¹¹, Luciane Lima da Silva¹²**

¹ Centro Universitário Santo Agostinho, (mariferreira2503@gmail.com)

² Centro Universitário Santo Agostinho, (dieh.gs21@gmail.com)

³ Centro Universitário Santo Agostinho, (danielsgomes@gmail.com)

⁴ Centro Universitário Santo Agostinho, (lorenlimafisio@gmail.com)

⁵ Centro Universitário Santo Agostinho, (carlasantos061998@gmail.com)

⁶ Centro Universitário Santo Agostinho, (maizaribeiro47@gmail.com)

⁷ Centro Universitário Santo Agostinho, (danyeh97@gmail.com)

⁸ Centro Universitário Santo Agostinho, (rosalice.127@gmail.com)

⁹ Centro Universitário Santo Agostinho, (amaliargv@hotmail.com)

¹⁰ Centro Universitário Santo Agostinho, (emanuelmacedoc@gmail.com)

¹¹ Centro Universitário Santo Agostinho, (fisio.suelengommes@gmail.com)

¹² Centro Universitário Santo Agostinho, (lucianenppm@yahoo.com.br)

Resumo

Introdução: A pele constitui uma proteção primária contra agentes agressores que, de acordo com a intensidade, podem provocar lesões neste tecido, ativando o processo de reparação tecidual. A janaguba (*Himatanthus drasticus*) tem sido utilizada como recurso terapêutico na cicatrização por sua ação anti-inflamatória, antimicrobiana e analgésica. Outro meio terapêutico, o LED, utiliza-se da fotomodulação para efeitos no processo cicatricial. **Objetivo:** Avaliar a ação cicatrizante da terapia LED associada à *H. drasticus* em tecidos lesionados de ratos Wistar. **Método:** Estudo do tipo experimental, analítico, controlado, aleatorizado e com duplo mascaramento, tendo amostra composta por 20 ratos, distribuídos em 04 grupos.

Resultados: Os resultados apresentaram que não houve diferença estatística significativa entre as médias de células inflamatórias e reparatória dos grupos analisados ($p>0,05$). **Conclusão:** A aplicação associada da terapia LED com *H. drasticus* no tratamento de feridas em ratos Wistar mostrou efeitos terapêuticos evidenciados pelo aumento no número de células reparatórias (fibroblastos), porém os resultados não demonstraram significância estatística.

Palavras-chave: Cicatrização; Fototerapia; Recursos naturais; Fisioterapia.

Área Temática: Temas transversais – Outros.

E-mail do autor principal: mariferreira2503@gmail.com

1 INTRODUÇÃO

De acordo com Azulay (2017) a pele constitui uma proteção primária contra agentes agressores que, de acordo com a intensidade, podem provocar lesões neste tecido, ativando o processo de reparação tecidual, dividido em 3 fases: inflamatória, formação tecidual ou fase proliferativa e remodelação da ferida. É relatado por Alberto *et al.* (2017) e Panobianco *et al.* (2012) que a cicatrização tem por objetivo reestabelecer a plenitude, morfológica e funcional, da pele ou tecido lesionado, promovendo assim a substituição do tecido lesado por um novo.

A medicina popular brasileira, utiliza recursos naturais para fins terapêuticos, através, por exemplo, da fabricação de garrafadas ou leites, segundo levantamento de Soares *et al.* (2015). Saraiva (2015) e Soares *et al.* (2016) destacam em seus estudos uma planta nativa, chamada regionalmente de janaguba, utilizada para tratamento de úlceras gástricas, feridas, câncer, entre outros males.

A janaguba (*Himatanthus drasticus*) é descrita por Almeida *et al.* (2017) e Soares *et al.* (2016) como sendo uma planta arbórea, que pode ser encontrada nas regiões norte, nordeste e centro-oeste do Brasil, além da Guiana Francesa, Guiana e Suriname. Esses estudos apontam ação anti-inflamatória, antimicrobiana, analgésica, evidenciando os efeitos medicinais desta planta nativa sul-americana.

No cuidado ambulatorial da reparação tecidual, o LED (Light Emitting Diodes ou Diodos Emissores de Luz, em tradução livre) recurso da fototerapia que utiliza a fotomodulação para produção de efeitos terapêuticos, é uma ferramenta indicada para a melhora do processo de cicatrização, em decorrência de seus efeitos fisiológicos no processo cicatricial, que de acordo com Agne (2017), promove a aceleração do processo inflamatório, regeneração nervosa e reabsorção de edemas.

No processo de cicatrização, o LED tem seu efeito por estimular o aumento da proliferação de fibroblastos, que segundo revisões de Jagdeo *et al.* (2018), reforçam o metabolismo celular, transformar fibroblastos em miofibroblastos, além de já citado anteriormente, incrementar a (pro) síntese de colágeno.

O baixo custo, a facilidade no manuseio da aplicação da terapia LED e a segurança no tratamentos são descritos por Agne (2017) e Jagdeo *et al.* (2018) como fatores que contribuem para a rápida adesão deste recurso fototerapêutico nas clínicas de recuperação.

Diante disto, o trabalho tem por objetivo avaliar a ação cicatrizante da terapia LED associada à *H. drasticus* em tecidos lesionados de ratos Wistar.

2 MÉTODO

O presente estudo é do tipo experimental, analítico, controlado, aleatorizado, prospectivo, com duplo mascaramento (patologista e estatístico), tendo sido realizado após a aprovação do CEUA (comitê de ética envolvendo pesquisas com animais), tendo por número do parecer 4169/19.

A amostra foi composta por 20 ratos wistar (*rattus norvegicus*), distribuídos, aleatoriamente, em 04 grupos, utilizando o programa de distribuição randomizada disponível no site www.randomization.com. Os grupos experimentais foram organizados da seguinte forma: grupo controle (Grupo Controle), grupo com intervenção com terapia LED (Grupo LED), grupo de tratamento com extrato em gel de *H. drasticus* (Grupo Planta) e grupo de terapia com aplicação de terapêutica LED associada a aplicação de extrato em gel de *H. drasticus* (Grupo LED + Planta).

Os animais permaneceram no biotério desta instituição, em gaiolas coletivas, agrupados em número de 5 animais por gaiola, dispondo de água e ração de modo *ad libitum*. O ambiente foi mantido à temperatura constante de 22°C, com manutenção do grau de umidade e períodos controlados de 12 horas de luz (iniciando-se a fase clara às 07:00 horas), de acordo com os critérios do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Os procedimentos experimentais foram realizados no Laboratório de Fisiologia do Centro Universitário Santo Agostinho (UNIFSA).

Foram adotados os seguintes critérios de inclusão: ratos da raça wistar, espécie *rattus norvegicus*, machos ou fêmeas, com massa corpórea entre 250 e 300g e provenientes do biotério do Centro Universitário Santo Agostinho (UNIFSA). Definiu-se como critérios de exclusão

ratos de outras raças, massa corpórea abaixo de 250 g e acima de 300 g e oriundos de fora do biotério do Centro Universitário Santo Agostinho (UNIFSA).

Para a preparação do extrato etanólico das folhas de *H. drasticus* foram coletadas 1000 g de folhas de *H. drasticus*, que foram higienizadas com água filtrada e colocadas para secagem ao sol.

Na obtenção do extrato etanólico, foi usado uma proporção de 1:5 p/v (1g da planta seca para cada 5mL de álcool etílico 70%). Após a coleta o material botânico foi triturado em liquidificador convencional, pesado em balança semi analítica (226,60g) e acondicionado com o solvente extrator (1148mL) à temperatura ambiente em frasco âmbar com tampa rosqueada por sete dias, sendo agitado periodicamente. Após esse período, a solução foi filtrada por filtração a vácuo e em seguida concentrada em rotaevaporador sob pressão reduzida a uma temperatura de 40 °C. Finalmente, o extrato foi armazenado sob temperatura ambiente, ao abrigo da luz.

Após o período destinado ao armazenamento, usou-se, para a obtenção do extrato em gel da *H. drasticus*, arbopol 1,5%, Metilparabeno 0,1%, Aminimetilpronanol q.s.p p/pH 6 e água destilada Qsp 50g. Em bécher de plástico, colocou-se a água destilada e, logo após, adicionado o metilparabeno, agitou-se a mistura obtida. O Carbopol foi disperso na mistura anterior e deixado em repouso por 24 horas. Após este período, este foi colocado no agitador em baixa rotação e adicionando o AMP até atingir pH 6,0. Novamente, agitou-se até completa homogeneização. Após o gel pronto foi adicionado o extrato da planta na concentração de 5% (2,5g) usando 48,5g do gel. o extrato foi solubilizado com propilenoglicol em quantidade suficiente. Estes procedimentos foram realizados no Serviço Escola de Farmácia do Centro Universitário Santo Agostinho - UNIFSA.

Previamente a cada procedimento cirúrgico, indução do ferimento cutâneo e coleta de tecido, e após a pesagem dos animais em balança semi analítica, foi aplicada anestesia com injeção intramuscular de cloridrato de quetamina (100mg/kg) e cloridrato de xilazina (50mg/kg) no músculo gastrocnêmio dos animais, utilizando seringa de 1 mL e agulha 13 x 3 mm (30 G ½). Ao final realizou-se analgesia com cloridrato de tramadol (5mg/kg) em todos os ratos.

Na indução dos ferimentos cutâneos cirúrgicos no dorso dos animais, inicialmente foi realizada demarcação com um retângulo com auxílio de gabarito de acetato (3 x 6 cm) e caneta dermatográfica a partir da linha transversa interescapular superior, em sentido crânio-caudal no dorso do animal. Em seguida fez-se uma epilação e com auxílio de um bisturi, com lâmina nº15 estéril, realizou-se a incisão na linha mediana dorsal, sobre a linha traçada acima descrita,

incluindo pele e panículo carnosos até a fáscia muscular. A hemostasia foi feita aplicando-se suave manobra de compressão com gaze estéril seca.

Após a realização da incisão, cada animal foi posicionado para receber irradiação, ou extrato de *H. drasticus*, ou ambos, dependendo do grupo da pesquisa utilizado.

Para os grupos tratados com LED, após o posicionamento de cada animal e da caneta LED, foi realizada a aplicação de LED terapêutico de modo pontual, sem contato e perpendicular à incisão. A caneta do aparelho foi posicionada de modo a permanecer imóvel durante o procedimento e envolvida por filme plástico de policloreto de vinila (PVC), sendo trocado após a irradiação em cada animal. As irradiações com LED âmbar foram realizadas a cada 24 horas, durante 15 dias consecutivos, sempre no período vespertino, sendo a primeira aplicação 5 minutos após a indução cirúrgica do ferimento.

Foi utilizado o LED âmbar com comprimento de onda de $617 \text{ nm} \pm 10\%$; sistema de fornecimento de feixe: LED (diodos emissores de luz); não colimado; feixe de luz incoerente; espectro eletromagnético do LED: Âmbar (Visível); potência do LED $1500 \text{ mW} \pm 10\%$.

Após o tratamento (14 dias consecutivos), os grupos foram anestesiados com quetamina e xilazina e em seguida foi feita a retirada da região onde havia ferimento para a análise histopatológica. Foi demarcado a área de coleta de tecido correspondente ao terço médio da cicatriz, abrangendo 1 cm de tecido cicatricial e 2 cm de pele adjacente (1 cm de cada lado). Com auxílio de bisturi, a área tecidual correspondente ao terço médio da cicatriz e pele adjacente foi retirada, incluindo tecido cicatricial e dérmico em toda sua profundidade. Após obtenção dos tecidos, os animais foram submetidos à MII com hiperdosagem da mistura anestésica via intraperitoneal por cloridrato de quetamina (1g/Kg) e cloridrato de xilazina (500mg/Kg).

Para preparação histológica, o tecido foi fixado em formol 10% por um período de 24h, em seguida a peça foi desidratada em etanol absoluto com porcentagens crescentes (50%, 70%, 80%, 90%) por períodos de 1h e finalmente em etanol absoluto 100% durante 8h. Após a desidratação a peça foi diafanizada em xilol por 4h, permanecendo em parafina por 4h em estufa a 58°C e após isso emblocada para a realização dos cortes histológicos.

As peças foram coradas com Hematoxilina Eosina (H.E) e examinadas com um

microscópio óptico trinocular Olympus CX31, modelo YS100, equipado com câmera digital Olympus SC20 e acoplado a um microcomputador, sendo observado as seguintes características nas lâminas coradas com H.E: arranjo das fibras de colágeno, neovascularização (ausente, leve, média ou severa) e tipos de células inflamatórias e cicatriciais predominantes.

A análise estatística foi realizada utilizando o software estatístico IBM® SPSS® 22 for Windows para análises de one way ANOVA (não paramétrico), Teste de Tukey com nível de significância de 5% ($p < 0,05$) e teste de Shapiro-Wilk com nível de 95% de confiança.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os animais apresentaram as feridas limpas sem alterações evidentes e estavam todos em bom estado de higiene.

Logo abaixo, na figura 1, podemos observar macroscopicamente as evoluções cicatriciais da área lesada das amostras, em um período de 7 e 14 dias de intervenção proposta para cada grupo.

FIGURA 1. EVOLUÇÃO DO PERÍODO CICATRICAL EM 7 E 14 DIAS.

Legenda: **A:** Controle 7 dias; **B:** Controle 14 dias; **C:** Led 7 dias; **D:** Led 14 dias; **E:** Planta 7 dias; **F:** Planta 14 dias; **G:** Led + Planta 7 dias; **H:** Led+Planta 14 dias.

Fonte: Autores, 2019.

A análise histopatológica dos tecidos coletados após os 14 dias de intervenções estão expostas na figura 2.

FIGURA 2. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DA ÁREA CICATRICAL EM 7 E 14 DIAS

Legenda: **A:** Controle; **B:** LED; **C:** Planta; **D:** Led+ Planta.

Fonte: Autores, 2019.

A tabela 1 nos mostra os valores das análises descritivas dos resultados dos tecidos em cada tratamento, dispondo de: número máximo e mínimo, média, desvio-padrão e p-valor de células contadas em cada grupo amostral.

TABELA 1. ANÁLISE DESCRITIVA DOS RESULTADOS OBTIDOS

Células	Mínimo	Máximo	Média	Desvio-Padrão	P-Valor*
Mononucleadas					
Controle	2	11	6,6	3,4	0,9110
Planta	1	7	4,0	2,4	0,5720
LED	2	10	4,4	3,4	0,1990
LED + Planta	1	9	4,2	3,9	0,2500
Polimorfonuclear					
Controle	2	8	4,2	3,9	0,1030
Planta	1	7	4,2	2,2	0,1950
LED	0	6	3	2,2	0,8500
LED + Planta	0	4	2,2	1,7	0,8500
Fibroblastos					
Controle	1	5	3,6	1,7	0,2720
Planta	2	7	4,6	2,1	0,8500
LED	1	6	3,6	2,5	0,1200
LED + Planta	4	7	5,5	1,3	0,9720

*Teste de Shapiro-Wilk (95% de confiança).

Fonte: Autores, 2019.

Todas as variáveis apresentam distribuição normal. Então para realizar a análise de comparação de médias, utilizamos a ANOVA e o teste de Tuckey ao nível de 95% de confiança.

O gráfico 1 nos mostra de forma explícita e comparativa a quantidade de células inflamatórias e reparadoras de cada grupo tratado.

GRÁFICO 1. PREDOMINÂNCIA DE CÉLULAS MONONUCLEADAS, POLIMORFONUCLEADAS E FIBROBLASTOS POR GRUPO DE TRATAMENTO

Todos os dados obtidos na análise histopatológica foram tabulados e organizados no

Microsoft® Office Excel 2016 e analisados no software IBM® SPSS® 22 for Windows.

Na análise do aspecto das lesões (figura 1), no 7º dia de pós-operatório as feridas de todos os animais estavam com tamanhos semelhantes, com aparência de processo cicatricial. Logo no 14º dia, nos grupos LED, Planta e LED + Planta as crostas que se formaram foram mais intensas e as áreas estavam com tamanhos menores em relação ao grupo controle, com epitelização quase completa e com surgimento de novos pelos ao redor da lesão. Um estudo de Nogueira (2014) mostrou o mesmo resultado positivo quanto ao uso da terapia LED no tratamento de feridas cutâneas em ratos, com diferença significativa na porcentagem de regressão da ferida e diminuição das células inflamatórias, com rápida reepitelização a partir das bordas da ferida.

Após a verificação microscópica dos tecidos (figura 2, tabela 1) podemos observar que o grupo controle obteve alto número de células inflamatórias (polimorfonucleadas e mononucleadas), diminuída área de colágeno ao longo das estruturas e local diversificado com infiltrados inflamatórios, com matriz edemaciada e frouxa. Já nos grupos LED, LED + Planta e Planta evidenciaram-se que os tecidos colágenos apresentam-se em quantidade abundante, porém desorganizados, em contrapartida, nos dois primeiros grupo citados, houve elevado número de fibroblastos e infiltrados inflamatórios, enquanto no último, há presença de fibroblastos diversificados, mas pouco número de células inflamatórias. Em um estudo semelhante, Leite *et al.* (2014) demonstrou que a terapia com LED, promove a proliferação celular, incluindo células epiteliais e endoteliais, queratinócitos, macrófagos, linfócitos e fibroblastos contribuindo por acelerar o reparo tecidual.

Na análise descritiva dos resultados deste estudo (tabela 1) observou-se maior predominância de células mononucleares no grupo controle (Média $\pm$ 6,6). Já as células polimorfonucleares, mostraram maior predominância tanto no grupo controle (Média $\pm$ 4,2) como no grupo planta (Média $\pm$ 4,2). Esse resultado em relação à planta, está de acordo com o estudo de Santos *et al.* (2017) que analisou a aplicação do látex de *H. drásticus* em feridas, onde evidenciou um potencial de reparação, por modular positivamente os parâmetros de cicatrização através da participação de mastócitos (célula polimorfonuclear) que pode estar associado à presença do lupeol em sua composição.

Segundo Souza (2015) observou-se também efeito positivo da planta sobre os fibroblastos, coincidindo com um estudo que autor descreve que a aplicação do extrato de *H.*

drasticus teve ação anti-inflamatória, por regular a migração e atividade de polimorfonucleares e modular a liberação de citocinas pró-inflamatórias antecipando a fase proliferativa e contribuindo para a migração e atividade dos fibroblastos, levando a uma maior deposição de colágeno e acelerando a contração das feridas, além de melhor organizar a estruturação do novo epitélio.

De acordo com o gráfico 1, nota-se que houve predominância de células inflamatórias no grupo controle (polimorfonucleares e mononucleares), no grupo LED poucas células inflamatórias, porém em maior quantidade que os fibroblastos, já no grupo planta e LED + planta destacam-se as células de reparação (fibroblastos), principalmente no grupo planta, no entanto o grupo LED + planta apresenta menor número de células inflamatórias em comparação aos outros grupos.

Quanto ao efeito positivo observado pela associação da planta com o LED, na revisão da literatura realizada, não foram encontrados trabalhos clínicos ou experimentais que oferecessem fundamentos científicos para a ação terapêutica resultante da associação dos mesmos, sendo este estudo, pioneiro na realização de tal pesquisa.

Este resultado demonstra que as diferentes intervenções aplicadas nos grupos amostrais, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os mesmos. O que pode ser atribuído a fatores como pequena quantidade amostral, concentração do extrato e dose terapêutica, mostra-se assim, a necessidade de novos estudos para que se tenha informações mais precisas a respeito da ação terapêutica da *H. drasticus* e de sua associação com o LED.

4 CONCLUSÃO

A partir das análises macroscópicas e microscópicas realizadas, evidenciou-se que a aplicação das intervenções associadas de terapia LED com *H. drasticus* no tratamento de feridas em ratos Wistar, no tempo experimental de 14 dias, mostrou efeitos terapêuticos na cicatrização dos ferimentos, evidenciado pelo aumento no número de células reparatórias (fibroblastos), porém os resultados não demonstraram significância estatística.

REFERÊNCIAS

AGNE, J. E. Eletrotermofototerapia. 4 ed. Santa Maria (RS): O Autor, 2017. 426p.

- ALBERTO, T. et al. Efeitos do Diodo Emissor de Luz (LED) Vermelho na Estimulação de Fibroblastos: Ênfase na Reparação Tecidual. *Revista Intellectus*, N°33, Vol 1, 2016: 94-105p.
- ALMEIDA, S.C. et al. *Himatanthus drasticus*: a chemical and pharmacological review of this medicinal species, commonly found in the Brazilian Northeastern region. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 27 (2017) 788–793.
- AZULAY, R. D. *Dermatologia* / Rubem David Azulay, David Rubem Azulay, Luna Azulay-Abulafia. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017. 1184p.
- JAGDEO, J. et al. Light-Emitting Diodes in Dermatology: A Systematic Review of Randomized Controlled Trials. *Lasers in Surgery and Medicine* 50:613–628 (2018).
- LEITE, S. et al. Phototherapy promotes healing of cutaneous wounds in undernourished rats. *An Bras Dermatol.* 2014;89(6):899-904.
- NOGUEIRA, V. et al. Biomodulation effects of LED and therapeutic ultrasound combined with semipermeable dressing in the repair process of cutaneous lesions in rats. *Acta Cirúrgica Brasileira* - Vol. 29 (9) 2014.
- PANOBIANCO, M. et al. Comparação da cicatrização pós-mastectomia entre mulheres portadoras e não-portadoras de diabetes mellitus. *Rev. Rene.*, 2012: 11:15-22.
- SANTOS, G. et al. Involvement of mast cells, CD68+ and VEGF+ expressions in response to *Himatanthus drasticus* commercial latex in mice wound healing model. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.69, n.3, p.513-522, 2017.
- SARAIVA, M. et al. Plant species as a therapeutic resource in areas of the savanna in the state of Pernambuco, Northeast Brazil. *Journal of Ethnopharmacology* 171 (2015) 141–153.
- SOARES, F. et al. Estudo etnofarmacológico e etnobotânico de *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel (janaguba). *Rev. Bras. Pl. Med.*, Campinas, v.17, n.4, supl. II, p.900-908, 2015.
- SOARES, F. et al. Avaliação da qualidade de amostras comerciais de leite de janaguba (*Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel) em Fortaleza – Ceará. *Rev. Bras. Pl. Med.*, Campinas, v.18, n.2, p.399-407, 2016.
- SOUZA, T. Modulação da resposta inflamatória e aceleração da cicatrização de feridas cutâneas experimentais pelas proteínas isoladas do látex de *Himatanthus drasticus* Mart. (Plumel). UFC - Universidade Federal do Ceará.; Ceará; 2015.