

Estudo pré-clínico de queimaduras experimentais tratadas com fotobiomodulação e membrana amniótica humana, isoladas e associadas*

Fernanda Cláudia Miranda Amorim^{1,2}

 <https://orcid.org/0000-0002-1648-5298>

Emília Ângela Loschiavo Arisawa²

 <https://orcid.org/0000-0003-3526-3890>

Luciana Barros Sant'anna²

 <https://orcid.org/0000-0002-5128-7414>

Ana Beatriz Mendes Rodrigues^{3,4}

 <https://orcid.org/0000-0001-8066-0022>

Davidson Ribeiro Costa²

 <https://orcid.org/0000-0002-9750-5675>

Destaques: (1) Associação de tecnologia com biomateriais. (2) Inovação na Engenharia de Tecidos. (3) Protocolo para tratamentos de queimaduras.

Objetivo: avaliar o efeito da fotobiomodulação com laser de baixa intensidade 660 nm isoladamente ou associada à membrana amniótica humana no reparo de queimaduras de espessura parcial em ratos. **Método:** estudo experimental com 48 ratos Wistar machos, randomizados em quatro grupos: Controle, Membrana Amniótica Humana, Terapia a Laser de Baixa Intensidade e Terapia a Laser de Baixa Intensidade associado à Membrana Amniótica Humana. As características histopatológicas das amostras de pele foram analisadas aos 7 e 14 dias após a queimadura. Os dados obtidos foram submetidos aos testes de Kolmogorov-Smirnov e Mann Whitney. **Resultados:** a análise histológica das lesões por queimadura mostrou a diminuição da inflamação ($p < 0,0001$) e aumento da proliferação de fibroblastos ($p < 0,0001$), principalmente nos 7 dias em todos os tratamentos relacionados ao grupo controle. Aos 14 dias, a maior efetividade na aceleração do processo cicatricial foi significativa ($p < 0,0001$) no grupo Terapia a Laser de Baixa Intensidade associado à Membrana Amniótica Humana. **Conclusão:** a associação das terapias de fotobiomodulação à membrana amniótica humana permitiu comprovar redução no tempo do processo cicatricial das lesões experimentais, estimulando sua proposição como protocolo de tratamento em queimaduras de espessura parcial.

Descritores: Queimaduras; Âmnio; Terapia com Luz de Baixa Intensidade; Cicatrização; Pele; Ratos.

* Artigo extraído da tese de doutorado "Terapia a Laser de baixa intensidade e membrana amniótica humana aplicadas em modelo experimental de queimadura", apresentada à Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, SP, Brasil.

¹ Centro Universitário UNINOVAFAP, Teresina, PI, Brasil.

² Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, SP, Brasil.

³ Faculdade de Ciências da Saúde Pitágoras de Codó, Codó, MA, Brasil.

⁴ Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI, Brasil.

Como citar este artigo

Amorim FCM, Arisawa EAL, Sant'Anna LB, Rodrigues ABM, Costa DR. Preclinical study of experimental burns treated with photobiomodulation and Human Amniotic Membrane, both isolated and associated. Rev. Latino-Am. Enfermagem. 2023;31:e3726. [Access   ]; Available in:  <https://doi.org/10.1590/1518-8345.5552.3726>

Introdução

As queimaduras em pele são lesões ocasionadas pelo calor, radiação, radioatividade, eletricidade, fricção ou contato com produtos químicos. No mundo, cerca de 180.000 pessoas morrem todos os anos em decorrência desse agravo, uma realidade também expressa na última década no Brasil pela alta taxa de mortalidade hospitalar por esta causa⁽¹⁻²⁾.

As queimaduras térmicas podem acontecer por escaldaduras (líquidos quentes), queimaduras de contato (sólidos quentes) ou queimaduras de chamas⁽¹⁾. Esses tipos de lesões, além de serem as mais prevalentes e extenuantes, prejudicam diretamente as fases do processo de cura adequada, pois apresentam como principais características a angiogênese reduzida, inflamação sustentada, estresse oxidativo, aumento da proteólise e septicemia⁽³⁾.

Quanto à profundidade, as queimaduras podem ser classificadas como: de espessura superficiais (primeiro grau), superficiais parciais (segundo grau), superficiais profundas (segundo grau) e de espessura total (terceiro ou quarto grau). Histologicamente, as queimaduras de espessura superficial atingem apenas epiderme; as de espessura superficiais parciais atingem a epiderme e derme papilar, mas os anexos da pele permanecem intactos; as de espessura superficiais profundas lesionam a epiderme e derme reticular e a maioria dos apêndices da pele encontram-se destruídos; nas de espessura total, toda a epiderme, derme e apêndices da pele encontram-se destruídos (terceiro grau), podendo inclusive envolver a fáscia muscular e/ou osso (quarto grau)⁽⁴⁾.

As principais características clínicas das lesões de espessura superficial parcial são eritema, flictenas, umidade, hiperemia, palidez à pressão e tempo de cicatrização de 7 a 20 dias⁽⁴⁾. Nesse sentido, o processo de cura de lesões por queimadura é complexo, uma vez que envolve células diferenciadas que são ativadas durante as fases distintas e sobrepostas do processo de reparo tecidual chamadas de inflamação, proliferação e remodelação⁽⁵⁾.

As lesões decorrentes de queimaduras estabelecem desafios no processo de reparação da pele, pois a área queimada apresenta características que dificultam o reparo como bordas irregulares e necrose tecidual, além de poder atingir a epiderme, a derme e os tecidos profundos. Destaca-se ainda a necessidade de internações e altos custos hospitalares⁽⁶⁾.

O ambiente multifacetado da cicatrização de feridas por queimaduras tem estimulado a investigação de intervenções terapêuticas inovadoras que viabilizem o reparo imediato deste agravo⁽⁷⁾. Desse modo, definir uma estratégia apropriada frente às necessidades e

complexidade das queimaduras torna-se fundamental para o sucesso de tratamentos terapêuticos em termos de desempenho e custo. Nesse sentido, biomateriais e novas tecnologias destacam-se por possuírem propriedades gerais capazes de induzir respostas biológicas distintas que podem ser adaptadas de acordo com a aplicação⁽⁸⁾.

No contexto das tecnologias, a fotobiomodulação com a utilização da Terapia a Laser de Baixa Intensidade (TLBI) tem se destacado por auxiliar a cicatrização de feridas por seus efeitos biomodulares⁽⁹⁻¹¹⁾. Em contrapartida, relacionado aos biomateriais, a Membrana Amniótica humana (MAh) tem sido usada como alternativa promissora, com grande potencial de aplicação na medicina regenerativa por apresentar baixa antigenicidade, proteção contra infecções e por atuar como substrato para a epitelização⁽¹²⁾. Portanto, diversos estudos avaliaram clinicamente o benefício da MAh como substituto biológico⁽¹³⁻¹⁵⁾.

Assim, considerando a complexidade da terapia de queimaduras e a necessidade de estudos experimentais que investiguem tratamentos alternativos que favoreçam a regeneração de tecidos neste agravo, o presente estudo avaliou o efeito da TLBI associada à MAh no reparo de queimaduras de espessura parcial superficial em ratos.

Método

Tipo de estudo

Trata-se de uma pesquisa experimental de abordagem quantitativa.

Local do estudo

A pesquisa foi realizada no laboratório de cirurgia experimental do Centro Universitário UNINOVAFAPI, localizado no município de Teresina (PI), Brasil.

Período do estudo

A coleta de dados ocorreu no período de janeiro a março de 2019.

Animais

Foram estudados 48 ratos machos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), 40 dias de vida, peso 200 ± 50 g, mantidos em gaiolas de polipropileno sob condições assépticas, alimentação específica com ração e água *ad libitum*, expostos a ciclo de 12/12 horas claro-escuro, alocados em gaiolas individuais.

Grupos de estudo

Os animais foram randomizados e alocados em quatro grupos, com doze animais cada: Controle (C);

animais submetidos a queimaduras experimentais sem tratamento; Membrana Amniótica Humana (MAh), ratos submetidos a queimaduras experimentais tratados com a aplicação de fragmento de MAh; Terapia a Laser de Baixa Intensidade (TLBI), animais submetidos a queimaduras experimentais tratados com TLBI; e TLBI+MAh, animais submetidos a queimaduras experimentais tratados com a associação de TLBI e MAh. Os animais dos 4 (quatro) grupos foram subdivididos, em 2 (dois) subgrupos conforme o tempo experimental de 7 e 14 dias, contendo 6 animais em cada.

Coleta de dados

O protocolo experimental foi desenvolvido em cinco etapas: captação da placenta humana, processamento do biomaterial, indução da queimadura, aplicação dos fragmentos da MAh e da TLBI, isoladas ou associadas.

As placentas foram captadas de duas parturientes selecionadas, após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), submetidas à cesariana eletiva, com história clínica saudável, exames sorológicos negativos para HIV-1, VDRL, HbsAg e anti-HCV, idade gestacional de 37 semanas a 41 semanas e 6 dias (placenta a termo), conforme critérios estabelecidos em estudo anterior⁽¹⁶⁾.

A placenta foi inspecionada imediatamente após a retirada, colocada em saco plástico estéril, acondicionada em temperatura de 10°C e transportada para o laboratório de cirurgia experimental. O biomaterial foi processado em ambiente asséptico, seguindo protocolos descritos⁽¹⁶⁾, isolando-se a MAh que seccionada em fragmentos de dimensões adequadas à presente pesquisa (4 x 4 cm) que foram utilizados em 24 h⁽¹⁷⁾.

Inicialmente, os animais foram pesados, sedados (Xilazina 2%, 0,01 mL/kg e Ketamina 10%, 0,005 mL/kg) e a região dorsal foi epilada. A queimadura experimental foi induzida utilizando-se uma proveta (3 cm de diâmetro), preenchida com 50 mL de água aquecida à 100°C, apoiada em contato direto com a pele da região depilada, durante 10 segundos cronometrados, sem pressão adicional. Em sequência, as lesões foram avaliadas considerando-se os aspectos macroscópicos, que incluíram a observação da coloração (vermelha ou rósea) e a presença de bolha para caracterização da queimadura de espessura parcial superficial⁽⁴⁾.

Os animais do grupo C não receberam tratamento. Nos animais dos grupos MAh e TLBI+MAh foram aplicados fragmentos da MAh, imediatamente após a queimadura, sempre com a face mesenquimal em contato com a área da lesão cutânea, excedendo em 1 cm suas bordas, e fixado com adesivo tópico.

O protocolo empregado nos animais do grupo TLBI incluiu aplicação do laser. As primeiras aplicações com laser ocorreram 30 minutos após a indução da queimadura, e se repetiram em intervalos de 24h. Foi utilizado o aparelho Laserpulse Ibramed® (Indústria Brasileira de Equipamentos Médicos - IBRAMED), e os parâmetros de irradiação usados no experimento foram: comprimento de onda de 660 nm, potência de 30 mW, com tempo de irradiação de 12 segundos por ponto, área de contato de 0,06310 cm², densidade de energia de 6 J/cm², parâmetros de pulso contínuo, com tratamento em dose única, em intervalo de 24 horas, cuja localização anatômica foi o dorso do animal.

As irradiações ocorreram de forma pontual em quatro pontos equidistantes, em formato de cruz, a 1 cm entre a borda da lesão e o ponto de irradiação, com ângulo de 90° e proteção da ponteira do laser com filme transparente estéril, evitando possível contaminação.

No grupo MAh + LBI, foram associados os protocolos descritos para os grupos MAh e TLBI, sendo que o laser foi aplicado sobre a membrana amniótica, a cada 24 horas, em ambos os tempos experimentais estudados (7 e 14 dias).

Os animais foram eutanasiados de acordo com o tempo experimental estudado (7 ou 14 dias) com administração de overdose de anestésico (tiopental sódico 100 mg/kg, via intraperitoneal). A área da queimadura e o tecido circundante foram cuidadosamente removidos e fixados em formalina tamponada neutra (10%).

Técnicas histológicas

A área da pele queimada e a área circundante, incluindo toda a área da lesão e as bordas do tecido normal adjacente (1 cm da borda), foram removidas e fixadas em formalina tamponada a 4% por 48 horas e, posteriormente, transferidas para solução de álcool 70%, depois diafanizados com xilol e emblocadas em parafina. Quatro cortes histológicos semisseriados longitudinais de 2 a 3 µm foram feitos de cada bloco, distendidos em lâminas de vidro e corados com Hematoxilina e Eosina (H&E) e Picrossirius Red.

Avaliações histológicas e morfométricas

A área lesionada foi avaliada macroscopicamente após a queimadura e durante todo o experimento considerando a coloração da pele, presença de flictenas e formação superficial da crosta. Os cortes histológicos corados com H&E foram digitalizados usando o microscópio Leica® DM 2500 acoplado à câmera Leica® DFC 425 e ao programa Leica® Application Suite LAS v3.7. As imagens foram obtidas das seções transversais de quatro campos sequenciais de cada lâmina, com as objetivas de 10X e

40X, em microscópio de luz. Para quantificar o número de células inflamatórias (neutrófilos e macrófagos) e fibroblastos (jovens e adultos), as imagens foram analisadas utilizando o *software* ImageJ, que possibilitou a elaboração de uma grade e a marcação individual dos núcleos celulares com o auxílio da ferramenta de contagem manual.

As lâminas coradas com Picrosirius Red foram avaliadas por meio de análise digital de imagens, para calcular a área ocupada pela deposição de colágeno dos tipos I e III, e fotografadas com a objetiva de 10X, com microscópio com luz polarizada (Leica® DM 2000) acoplado à câmera (Leica® DFC 425). Para a quantificação do percentual dos colágenos tipo I e III foi usado o programa Image-Pro Plus 4.5. A presença de colágeno, quando analisado em associação com luz polarizada, considerou as seguintes especificações para identificação dos tipos de colágenos: colágeno tipo I - coloração amarelo-avermelhada; e, colágeno tipo III - coloração verde-esbranquiçada. Todas as análises histomorfométricas foram realizadas de forma cega.

Análise estatística

Os dados coletados foram avaliados quanto ao coeficiente de variação e a distribuição amostral para a determinação do teste estatístico. Foram empregues

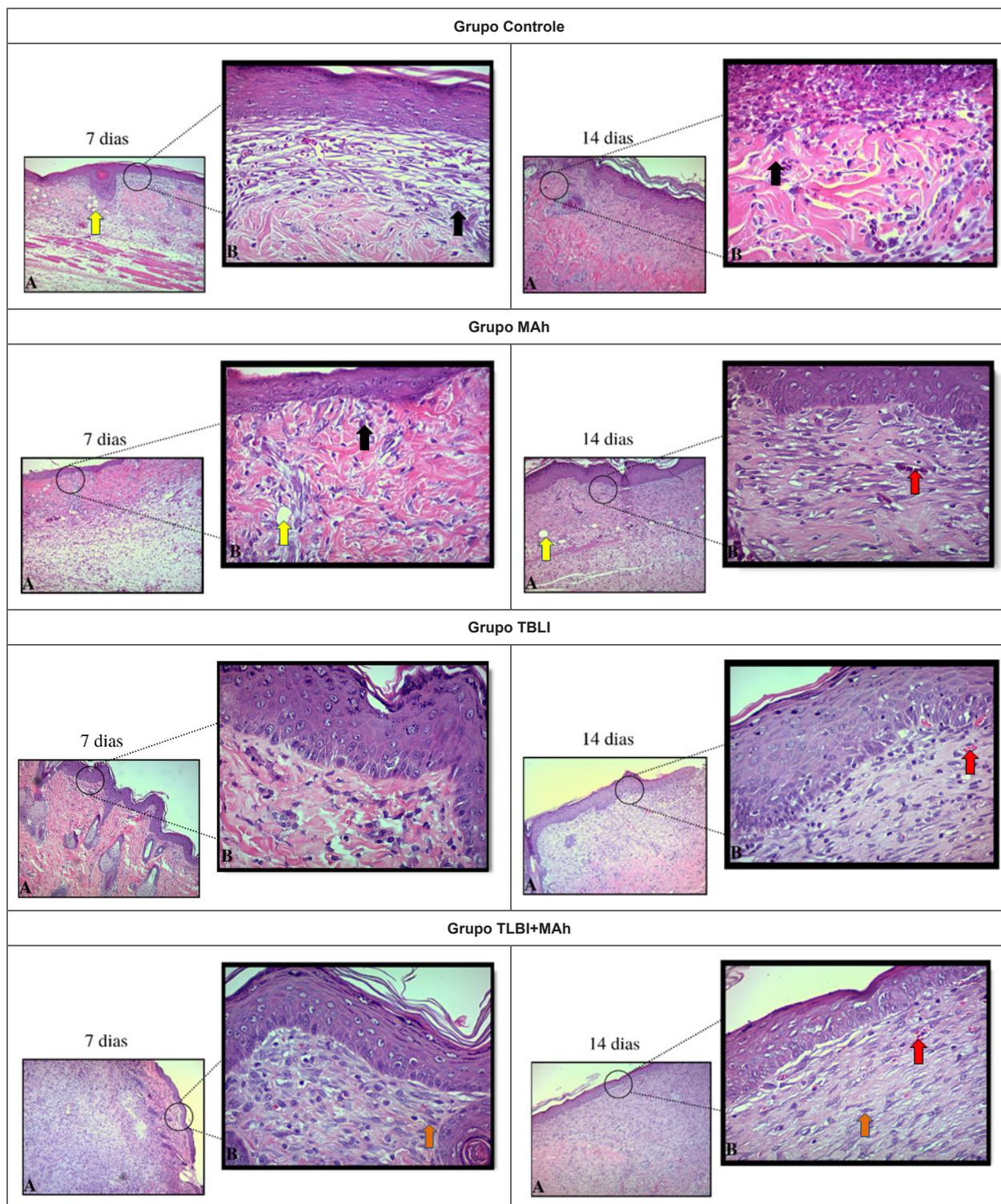
o programa GraphpadPrism V (GraphPad Software, California, USA) e o teste de Kolmogorov-Smirnov, para a análise da distribuição dos dados. Devido a apresentação não paramétrica, foi aplicado o teste Mann Whitney na análise intragrupos. Para a comparação entre os grupos, foi aplicado *Kruskal-Wallis test* com pós de *Dunn's Multiple Comparison Test* (comparações múltiplas – análise intergrupo). Considerou-se o intervalo de confiança de 95% e nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Os dados estão apresentados com média \pm erro padrão (da média).

Aspectos éticos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Vale do Paraíba (2.077.418) para a utilização da MAh e pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Centro Universitário UNINOVAFAPPI nº 005P/V2/2017, seguindo as recomendações propostas pela resolução 446/2012 do Conselho Nacional de Saúde (CNS).

Resultados

A avaliação das fotomicrografias das lâminas histológicas coradas com H&E mostram progressão da cicatrização das lesões após queimaduras de espessura superficial parcial em todos os grupos e tempos experimentais (Figura 1).



Aumento inferior A (10X) e superior B (40X)

As setas vermelhas representam os vasos sanguíneos, setas amarelas áreas de edema, setas pretas infiltrados inflamatórios e setas laranjas fibroblastos.

Figura 1 - Fotomicrografias mostrando alterações histopatológicas em queimaduras de espessura superficial parcial em ratos nos grupos C, TLBI, MAh e TLBI+MAh aos sete e quatorze dias. Teresina, PI, Brasil, 2022

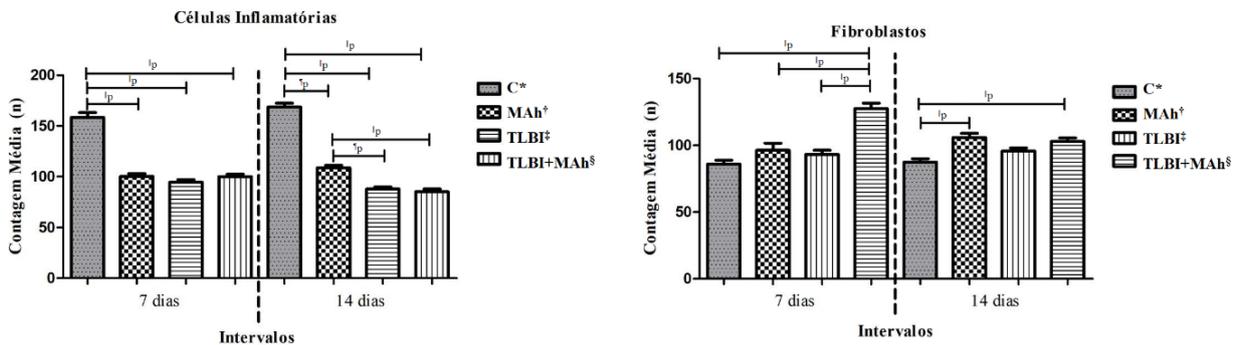
O uso de TLBI associada à MAh diminuiu significativamente o número de células inflamatórias em comparação com os demais protocolos de tratamento. Na análise intergrupos, foi evidenciado que o grupo C apresentou a maior média de células inflamatórias nos períodos analisados. Aos 14 dias, houve diferença

estatística nos animais dos grupos TLBI+MAh em relação ao grupo C e ao grupo MAh, com destaque para redução no número de células inflamatórias nos animais do TLBI+MAh (Figura 2).

Observou-se aumento no número de fibroblastos no grupo TLBI+MAh comparados aos grupos C, MAh

e TLBI no tempo experimental de 7 dias. No 14º dia, os animais dos grupos TLBI+MAh e MAh apresentaram

médias superiores quando comparados aos demais grupos (Figura 2).



Teste aplicado Kruskal-Wallis test com pós de Dunn's Multiple Comparison Test (comparações múltiplas – análise intergrupo).

*C = Grupo Controle; †MAh = Grupo Membrana Amniótica Humana; ‡TLBI = Grupo Terapia a Laser de Baixa Intensidade; §TLBI+MAh = Grupo Terapia a Laser de Baixa Intensidade associado à Membrana Amniótica Humana; □p = Diferença extremamente significativa ($p < 0,0001$); ¶p = Diferença significativa ($p < 0,05$)

Figura 2 – Efeito da fotobiomodulação com TLBI contínuo (660 nm) aplicado isoladamente e em associação com a MAh na contagem média de fibroblastos e células inflamatórias em queimaduras de espessura superficial parcial. Teresina, PI, Brasil, 2022

A análise intragrupo das células inflamatórias demonstrou que somente os grupos TLBI e TLBI+MAh evidenciaram diferenças estatisticamente significativas.

Com relação à média de fibroblastos, valores estatisticamente significativos foram observados nos grupos MAh e TLBI+MAh (Tabela 1).

Tabela 1 - Análise histopatológica intragrupo da média da contagem de Células Inflamatórias e Fibroblastos (média ± erro-padrão) após tratamento com TLBI (660 nm), MAh e combinação das terapias (TLBI + MAh) aos 7º e 14º dias após queimaduras térmicas de espessura superficial parcial em ratos (n = 48). Teresina, PI, Brasil, 2022

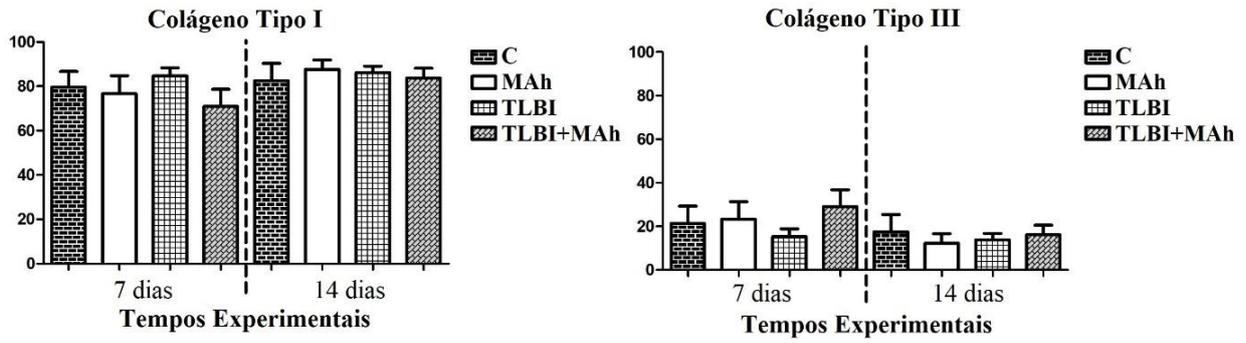
Grupos	Células Inflamatórias			Fibroblastos		
	Tempos experimentais			Tempos experimentais		
	7 dias	14 dias	p*	7 dias	14 dias	p*
Controle	158,4 ± 4,92	168,8 ± 3,64	ns [†]	85,8 ± 3,05	87,5 ± 2,42	ns [†]
MAh	100,5 ± 2,53	108,8 ± 2,40	ns [†]	96,2 ± 6,23	105,8 ± 5,31	p [‡]
TLBI	94,6 ± 2,43	87,5 ± 2,12	p [‡]	102,9 ± 2,56	97,04 ± 2,82	ns [†]
TLBI + MAh	99,42 ± 2,451	85,24 ± 2,64	p [‡]	134,4 ± 3,30	93,21 ± 3,04	p [§]

Teste aplicado Mann Whitney para análise intragrupos.

*p = Nível de Significância; †ns = Diferença não significativa; ‡p = Diferença significativa ($p < 0,05$); §p = Diferença extremamente significativa ($p < 0,0001$)

O percentual de colágeno dos tipos I e tipo III (%) nos períodos analisados, não diferiram entre os grupos experimentais. No entanto, quando comparados ao grupo

C, houve discreto aumento do Colágeno tipo III no grupo TLBI+MAh no sétimo dia, embora sem significância estatística (Figura 3).



Teste aplicado Kruskal-Wallis test com pós de Dunn's Multiple Comparison Test (comparações múltiplas - análise intergrupo).

Figura 3 – Representação gráfica do efeito da fotobiomodulação com TLBI e da membrana amniótica, aplicadas isoladamente ou em associação, no percentual de colágeno dos tipos III e I em queimaduras de espessura superficial parcial em ratos Wistar (n = 48). Teresina, PI, Brasil, 2022

A avaliação das fotomicrografias das lâminas histológicas coradas com picrossirius mostrando as fibras colágenas tipo I e III das lesões após queimaduras

superficial parcial em todos os grupos e tempos experimentais (Figura 4).

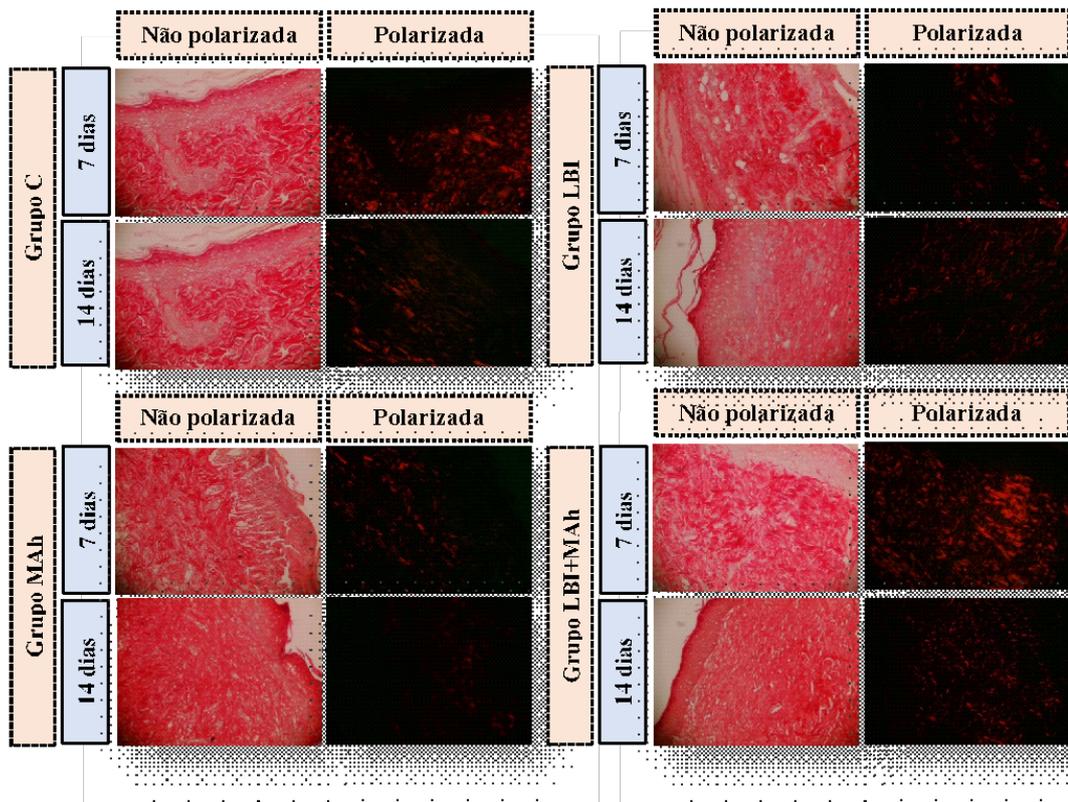


Figura 4 – Fotomicrografias observadas com luz polarizada e não polarizada mostrando fibras colágenas tipo I e III em queimaduras de espessura superficial parcial em ratos Wistar nos grupos C, MAh, TLBI e TLBI+MAh aos sete e quatorze dias, objetiva 10X (n = 48). Teresina, PI, Brasil, 2022

Discussão

O uso de ratos em pesquisas experimentais que envolvem o reparo tecidual em queimaduras têm sido

frequente, especialmente por estes apresentarem composição da pele (epiderme e derme) semelhantes à da pele humana, além disso, apresentam baixo custo e tempo de cicatrização reduzido. Contudo, a morfologia da

pele dos roedores é única e diferencia-se da arquitetura da pele humana por apresentar baixa aderência às estruturas subjacentes, presença da enzima l-gluconolactona que converte a l-gluconogamalactona em vitamina C, cicatrização por contração de ferida e menor risco de infecção⁽¹⁸⁾.

Este estudo investiga a associação da fotobiomodulação (TLBI) a MAh para tratamento de lesões por queimadura superficial parcial induzidas experimentalmente em ratos. Esta pesquisa avaliou o reparo tecidual nessas lesões e descreve a evolução do processo cicatricial utilizando as terapias isoladas e em associação nos tempos experimentais de 7 e 14 dias.

Estudos clínicos e experimentais publicados utilizaram TLBI para cicatrização de feridas agudas e crônicas, no entanto, há poucos relatos do uso desta tecnologia combinada com outras terapias em queimadura superficial parcial e nenhum estudo utilizando a MAh como adjuvante no tratamento^(7,10-11,19).

Em nossa pesquisa, verificou-se que nos tempos experimentais houve redução significativa das células inflamatórias em todos os grupos tratados em relação ao grupo controle. No entanto, constatou-se que, embora as terapias sejam eficazes na redução da inflamação, a combinação das terapias TLBI + MAh foi mais efetiva que o uso isolado de cada uma, evidenciando os efeitos aditivos na modulação da atividade inflamatória que o tratamento combinado pode promover. Considerando que os efeitos anti-inflamatórios do uso isolado dessas terapias em queimaduras já estão descritas na literatura, nossos achados evidenciam que o uso combinado destas potencializa a atividade inflamatória. Tais achados sugerem ainda que a terapia combinada age harmonicamente, sendo que a MAh funcionaria como substrato biológico e teria sua ação potencializada a partir do microambiente propício à oxigenação, crescimento e modulação celular criado com a luz irradiada.

Descobrimos que todas as terapias (isoladas e associadas) foram eficazes na redução das células inflamatórias nos dois tempos experimentais, tais achados revelam a importância do uso precoce destas para que o processo de reparo tecidual aconteça sem retardos. Nesse sentido, um estudo com feridas agudas induzidas revelou que a inflamação exacerbada e prolongada provoca prejuízos no processo de reepitelização pela modificação da formação do tecido de granulação, com aumento na possibilidade de formação de cicatriz⁽²⁰⁾.

Vale ressaltar que na análise intergrupos do segundo tempo experimental, a TLBI+MAh se apresentou extremamente eficaz quando comparadas às terapias isoladas. Além disso, a TLBI isolada foi mais eficaz na redução da média de células inflamatórias que o tratamento isolado das queimaduras com MAh.

A fotobiomodulação com TLBI tem sido usada com a finalidade de diminuir inflamação, redução da dor e do edema, além de preservar e restaurar tecidos danificados pela injúria. Estes efeitos podem ser alcançados utilizando comprimentos de onda entre 600 e 1000 nm⁽²¹⁾. Nesse sentido, estudos clínicos e experimentais com queimaduras de espessuras parcial e total têm utilizado a fotobiomodulação com TLBI com comprimento de onda de 660 nm, ratificando a escolha desse parâmetro também em nosso estudo^(5,19,22-23).

De maneira similar aos resultados encontrados em nosso estudo, a modulação da resposta inflamatória foi evidenciada na cicatrização de enxertos de pele em ratos em estudo recente que utilizou o mesmo protocolo de irradiação da TLBI⁽²⁴⁾. Além disso, corroborando com nossos achados, os efeitos com uso da dose única de TLBI têm sido apontados na literatura, entre eles, a aceleração da fase inflamatória em reparo de pele⁽²²⁾.

Sabe-se que a inflamação e a angiogênese são fatores importantes na determinação da cura de feridas e que a diminuição da inflamação viabiliza o aumento da angiogênese. Assim, as propriedades de modulação dos níveis de inflamação e proliferação celular são apresentadas em pesquisas com TLBI⁽²⁵⁻²⁶⁾.

No contexto da associação do TLBI com outras terapias no tratamento de queimaduras, um estudo que usou essa ferramenta combinada ao mel medicinal obteve resultados de atenuação da inflamação e da dor na cicatrização de queimadura e aceleração do processo de reparo caracterizado pelo aumento da proliferação celular⁽⁷⁾ corroborando com os mesmos efeitos do protocolo terapêutico de associação utilizado em nosso estudo.

Ressalta-se que para o tratamento de queimaduras de espessura parcial superficial são curativos ideais os que possuem a capacidade de preservar o calor, fornecer umidade, evitar a contaminação por microrganismos, ser seguro e não aderir à lesão ou necessitar de trocas frequentes⁽²⁷⁾. Logo, a MAh destaca-se por ser um biomaterial que possui todas as características elencadas⁽¹²⁾.

A MAh tem sido aplicada em feridas agudas e crônicas, conforme evidenciam os resultados promissores obtidos com a aplicação desse biomaterial na cicatrização dessas lesões devido às suas propriedades⁽²⁸⁻²⁹⁾. Destaca-se que os curativos utilizados com este biomaterial ou em associação deste com outros produtos podem facilitar a proliferação dos fibroblastos e contribuir com a liberação de fatores angiogênicos⁽³⁰⁾.

No contexto da análise intergrupos, quanto à proliferação de fibroblastos, nossos resultados mostram que a TLBI+MAh foi eficaz nos dois tempos experimentais. Destaca-se que a fibroplasia foi beneficiada pelo uso

das terapias combinadas, uma vez que já na fase inicial do experimento, a MAh pode ter modulado a ação da TLBI, potencializando o processo de ativação celular e, conseqüentemente, culminando no início precoce da fase proliferativa, caracterizada pelo aumento extremamente significativo de fibroblastos em relação a todos os outros grupos experimentais. Esse fato evidencia a alta capacidade de reparação do tecido queimado quando se optou pelo tratamento com as terapias associadas.

Estudos evidenciam resposta biológica favorecendo o processo de reparo tecidual por estímulo da proliferação de fibroblastos e melhoria na microcirculação também tem sido comprovada no contexto da fotobiomodulação com TLBI⁽³¹⁻³³⁾.

Os dados obtidos em nosso estudo reforçam as propriedades benéficas do uso da TLBI e da MAh relatadas em estudos anteriores no contexto do uso isolado destas terapias ou de sua associação com outros produtos^(7,30-34). No entanto, demonstramos que a associação das terapias (TLBI e MAh) em queimaduras pode apresentar excelentes resultados, pela somatória dos efeitos moduladores e protetores nas diferentes fases do reparo tecidual.

Considerando a complexidade do processo de cicatrização em queimaduras, nossos resultados se apresentam como uma fase pré-clínica que incentiva a ampliação das técnicas de avaliação dos efeitos determinados pela associação da TLBI e MAh, a fim de que sejam detectadas mais informações sobre a interação da fotobiomodulação com o biomaterial, visando uma futura introdução dessa terapia combinada em protocolos clínicos de tratamento de queimaduras de espessura parcial superficial.

Em nosso estudo não houve significância estatística para o percentual de colágeno dos tipos I e III nos períodos analisados, embora nas fotomicrografias verificou-se uma progressão no processo de organização celular evidenciado nos grupos de tratamento. Nesse sentido, sugerimos a ampliação do tempo experimental para contemplar toda dinâmica do processo de reparo. Ademais, declara-se como limitação do estudo a não mensuração da lesão, limitando o acompanhamento da contração da ferida. Além disso, não foram utilizados marcadores imunológicos, importantes avaliadores das reações tissulares e bioquímicas intrínsecas no reparo tecidual.

Conclusão

Nosso estudo mostrou que a fotobiomodulação com laser de baixa intensidade de 660 nm atua sinergicamente à aplicação tópica da membrana amniótica humana constituindo protocolo terapêutico eficaz no tratamento de queimaduras de espessura parcial superficial. A combinação entre as terapias potencializou os efeitos

anti-inflamatórios e de estímulo à proliferação celular, acelerando o processo de reparo tecidual.

Referências

1. World Health Organization. Burns fact sheet [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2018 [cited 2021 Apr 01]. Available from: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/burns>
2. Santos JV, Souza J, Amarante J, Freitas A. Burden of Burns in Brazil from 2000 to 2014: A Nationwide Hospital-Based Study. *World J Surg.* 2017;41(8):2006-12. <https://doi.org/10.1007/s00268-017-3988-5>
3. Zhang X, Wei X, Liu L, Marti GP, Ghanamah MS, Arshad MJ, et al. Association of increasing burn severity in mice with delayed mobilization of circulating angiogenic cells. *Arch Surg.* 2010;145(3):259-66. <https://doi.org/10.1001/archsurg.2009.285>
4. Abazari M, Ghaffari A, Rashidzadeh H, Badeleh SM, Maleki Y. A Systematic Review on Classification, Identification, and Healing Process of Burn Wound Healing. *Int J Low Extrem Wounds.* 2020;11:1534734620924857. <https://doi.org/10.1177/1534734620924857>
5. Brassolatti P, Bossini PS, Kido HW, Oliveira MCD, Almeida-Lopes L, Zanardi LM, et al. Photobiomodulation and bacterial cellulose membrane in the treatment of third-degree burns in rats. *J Tissue Viability.* 2018;27(4):249-56. <https://doi.org/10.1016/j.jtv.2018.10.001>
6. Saavedra PA, Brito ES, Areda CA, Escalda PM, Galato D. Burns in the Brazilian Unified Health System: a review of hospitalization from 2008 to 2017. *Int J Burns Trauma* [Internet]. 2019 [cited 2021 Apr 1];15;9(5):88-98. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6874777/>
7. Yadav A, Verma S, Keshri GK, Gupta A. Combination of medicinal honey and 904 nm superpulsed laser-mediated photobiomodulation promotes healing and impedes inflammation, pain in full-thickness burn. *J Photochem Photobiol B.* 2018;186:152-9. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.07.008>
8. Murray RZ, West ZE, Cowin AJ, Farrugia BL. Development and use of biomaterials as wound healing therapies. *Burns Trauma.* 2019 Jan 25;7:2. <https://doi.org/10.1186/s41038-018-0139-7>
9. Lamaro-Cardoso A, Bachion MM, Morais JM, Fantinati MS, Milhomem AC, Almeida VL, et al. Photobiomodulation associated to cellular therapy improve wound healing of experimental full thickness burn wounds in rats. *J Photochem Photobiol B.* 2019;194:174-82. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.04.003>
10. Nilforoushadeh MA, Kazemikhoo N, Mokmeli S, Zare S, Dahmardehei M, Vaghar Doost R, et al. An Open-Label Study of Low-Level Laser Therapy Followed by

- Autologous Fibroblast Transplantation for Healing Grade 3 Burn Wounds in Diabetic Patients. *J Lasers Med Sci*. 2019;10(Suppl 1):S7-S12. <https://doi.org/10.15171/jlms.2019.S2>
11. Vaghardoost R, Momeni M, Kazemikhoo N, Mokmeli S, Dahmardehei M, Ansari F, et al. Effect of low-level laser therapy on the healing process of donor site in patients with grade 3 burn ulcer after skin graft surgery (a randomized clinical trial). *Lasers Med Sci*. 2018;33(3):603-7. <https://doi.org/10.1007/s10103-017-2430-4>
12. Gholipourmalekabadi M, Farhadhosseinabadi B, Faraji M, Nourani MR. How preparation and preservation procedures affect the properties of amniotic membrane? How safe are the procedures? *Burns*. 2020 Sep;46(6):1254-71. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2019.07.005>
13. Raza MS, Asif MU, Abidin ZU, Khalid FA, Ilyas A, Tarar MN. Glycerol Preserved Amnion: A Viable Source of Biological Dressing for Superficial Partial Thickness Facial Burns. *J Coll Physicians Surg Pak*. 2020;30(4):394-8. <https://doi.org/10.29271/jcpsp.2020.04.394>
14. Ahuja N, Jin R, Powers C, Billi A, Bass K. Dehydrated Human Amnion Chorion Membrane as Treatment for Pediatric Burns. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2020 Nov;9(11):602-11. <https://doi.org/10.1089/wound.2019.0983>
15. Lashgari MH, Rostami MHH, Omid Etemad O. Assessment of outcome of using amniotic membrane enriched with stem cells in scar formation and wound healing in patients with burn wounds. *Bali Med J*. 2019;8(1):41-6. <https://doi.org/10.15562/bmj.v8i1.1223>
16. Sant'Anna LB, Cargnoni A, Ressel L, Vanosi G, Parolini O. Amniotic membrane application reduces liver fibrosis in a bile duct ligation rat model. *Cell Transplant*. 2011;20(3):441-53. <https://doi.org/10.3727/096368910X522252>
17. Sant'Anna LB, Hage R, Cardoso MA, Arisawa EA, Cruz MM, Parolini O, et al. Antifibrotic Effects of Human Amniotic Membrane Transplantation in Established Biliary Fibrosis Induced in Rats. *Cell Transplant*. 2016;13;25(12):2245-57. <https://doi.org/10.3727/096368916X692645>
18. Abdullahi A, Amini-Nik S, Jeschke M. G. Animal models in burn research. *Cell Mol Life Sci*. 2014;71(17):3241-55. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1612-5>
19. Allban AAH, Munahi AK, Kadhim A, Alzamili SKN. Low-Level Laser Therapy (Two Different Wavelengths 660nm and 820nm) Compared with *Nigella sativa* Oil for Treatment of Burns in Rats. *J Int Pharma Res [Internet]*. 2019 [cited 2021 Apr 1];46(4):346-52. Available from: https://www.researchgate.net/publication/349181330_Low_Level_Laser_Therapy_Two_Different_Wavelengths_660nm_and_820nm_Compared_with_Nigella_Sativa_Oil_for_Treatment_of_Burns_in_Rats
20. Qian LW, Fourcaudot AB, Yamane K, You T, Chan RK, Leung KP. Exacerbated and prolonged inflammation impairs wound healing and increases scarring. *Wound Repair Regen*. 2016 Jan-Feb;24(1):26-34. <https://doi.org/10.1111/wrr.12381>
21. Huang YY, Sharma SK, Carroll J, Hamblin MR. Biphasic dose response in low level light therapy - an update. *Dose Response*. 2011;9(4):602-18. <https://doi.org/10.2203/dose-response.11-009.Hamblin>
22. Andrade ALM, Brassolatti P, Luna GF, Parisi JR, Oliveira AML, Frade MAC, et al. Effect of photobiomodulation associated with cell therapy in the process of cutaneous regeneration in third degree burns in rats. *J Tissue Eng Regen Med*. 2020;14(5):673-83. <https://doi.org/10.1002/term.3028>
23. Amadio EM, Marcos RL, Serra AJ, Santos SA, Caires JR, Fernandes GHC, et al. Effect of photobiomodulation therapy on the proliferation phase and wound healing in rats fed with an experimental hypoproteic diet. *Lasers Med Sci*. 2021;36(7):1427-35. <https://doi.org/10.1007/s10103-020-03181-1>
24. Moreira SH, Pazzini JM, Alvarez JLG, Cassino PC, Bustamante CC, Bernardes FJL, et al. Evaluation of angiogenesis, inflammation, and healing on irradiated skin graft with low-level laser therapy in rats (*Rattus norvegicus albinus wistar*). *Lasers Med Sci*. 2020;35(5):1103-9. <https://doi.org/10.1007/s10103-019-02917-y>
25. Rathnakar B, Rao BS, Prabhu V, Chandra S, Rai S, Rao AC, et al. Photo-biomodulatory response of low-power laser irradiation on burn tissue repair in mice. *Lasers Med Sci*. 2016;31(9):1741-50. <https://doi.org/10.1007/s10103-016-2044-2>
26. Gupta A, Keshri GK, Yadav A, Gola S, Chauhan S, Salhan AK, et al. Superpulsed (Ga-As, 904 nm) low-level laser therapy (LLLT) attenuates inflammatory response and enhances healing of burn wounds. *J Biophotonics*. 2015;8(6):489-501. <https://doi.org/10.1002/jbio.201400058>
27. ISBI Practice Guidelines Committee; Steering Subcommittee; Advisory Subcommittee. ISBI Practice Guidelines for Burn Care. *Burns*. 2016 Aug;42(5):953-1021. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2016.05.013>
28. Han LG, Zhao QL, Yoshida T, Okabe M, Soko C, Rehman MU, et al. Differential response of immortalized human amnion mesenchymal and epithelial cells against oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 2019;135:79-86. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.02.017>
29. Campelo MBD, Santos JAF, Maia ALM Filho, Ferreira DCL, Sant'Anna LB, Oliveira RA, et al. Effects of the application of the amniotic membrane in the healing process of skin wounds in rats. *Acta Cir Bras*. 2018;33(2):144-55. <https://doi.org/10.1590/s0102-86502018002000006>

30. Rahman MS, Islam R, Rana MM, Spitzhorn LS, Rahman MS, Adjaye J, et al. Characterization of burn wound healing gel prepared from human amniotic membrane and *Aloe vera* extract. BMC Complement Altern Med. 2019;19(1):115. <https://doi.org/10.1186/s12906-019-2525-5>
31. Ranjbar R, Takhtfooladi MA. The effects of low level laser therapy on *Staphylococcus aureus* infected third-degree burns in diabetic rats. Acta Cir Bras. 2016;31(4):250-5. <https://doi.org/10.1590/S0102-865020160040000005>
32. Hashmi JT, Huang YY, Osmani BZ, Sharma SK, Naeser MA, Hamblin MR. Role of low-level laser therapy in neurorehabilitation. PM R. 2010;2(12 Suppl 2):S292-S305. <https://doi.org/10.1016/j.pmrj.2010.10.013>
33. Ihsan FR. Low-level laser therapy accelerates collateral circulation and enhances microcirculation. Photomed Laser Surg. 2005 Jun;23(3):289-94. <https://doi.org/10.1089/pho.2005.23.289>
34. Kshersagar J, Kshirsagar R, Desai S, Bohara R, Joshi M. Decellularized amnion scaffold with activated PRP: a new paradigm dressing material for burn wound healing. Cell Tissue Bank. 2018;19(3):423-36. <https://doi.org/10.1007/s10561-018-9688-z>

Contribuição dos autores

Concepção e desenho da pesquisa: Fernanda Cláudia Miranda Amorim, Emilia Ângela Loschiavo Arisawa, Luciana Barros Sant'anna. **Obtenção de dados:** Fernanda Cláudia Miranda Amorim, Ana Beatriz Mendes Rodrigues. **Análise e interpretação dos dados:** Fernanda Cláudia Miranda Amorim, Emilia Ângela Loschiavo Arisawa, Luciana Barros Sant'anna, Ana Beatriz Mendes Rodrigues, Davidson Ribeiro Costa. **Análise estatística:** Fernanda Cláudia Miranda Amorim, Ana Beatriz Mendes Rodrigues, Davidson Ribeiro Costa. **Redação do manuscrito:** Fernanda Cláudia Miranda Amorim, Emilia Ângela Loschiavo Arisawa, Luciana Barros Sant'anna, Ana Beatriz Mendes Rodrigues, Davidson Ribeiro Costa. **Revisão crítica do manuscrito quanto ao conteúdo intelectual importante:** Fernanda Cláudia Miranda Amorim, Emilia Ângela Loschiavo Arisawa, Luciana Barros Sant'anna, Ana Beatriz Mendes Rodrigues, Davidson Ribeiro Costa.

Todos os autores aprovaram a versão final do texto.

Conflito de interesse: os autores declararam que não há conflito de interesse.

Recebido: 07.07.2021

Aceito: 08.07.2022

Editor Associado:
Ricardo Alexandre Arcêncio

Autor correspondente:
Fernanda Cláudia Miranda Amorim
E-mail: fernanda.amorim@uninovafapi.edu.br
 <https://orcid.org/0000-0002-1648-5298>

Copyright © 2023 Revista Latino-Americana de Enfermagem
Este é um artigo de acesso aberto distribuído sob os termos da Licença Creative Commons CC BY.

Esta licença permite que outros distribuam, remixem, adaptem e criem a partir do seu trabalho, mesmo para fins comerciais, desde que lhe atribuam o devido crédito pela criação original. É a licença mais flexível de todas as licenças disponíveis. É recomendada para maximizar a disseminação e uso dos materiais licenciados.