



Universidade do Vale do Paraíba

UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA
INSTITUTO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA
DOUTORADO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA

FERNANDA CLÁUDIA MIRANDA AMORIM

**TERAPIA A LASER DE BAIXA INTENSIDADE E MEMBRANA AMNIÓTICA
HUMANA APLICADAS EM MODELO EXPERIMENTAL DE QUEIMADURA**

SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
2021

FERNANDA CLÁUDIA MIRANDA AMORIM

**TERAPIA A LASER DE BAIXA INTENSIDADE E MEMBRANA AMNIÓTICA
HUMANA APLICADAS EM MODELO EXPERIMENTAL DE QUEIMADURA**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Biomédica da Universidade do Vale do Paraíba, como complementação dos créditos necessários para obtenção do grau de Doutor em Engenharia Biomédica.

Orientadora: Profa Dra Emilia Angela Lo Schiavo Arisawa

SÃO JOSÉ DOS CAMPOS

2021

TERMO DE AUTORIZAÇÃO DE DIVULGAÇÃO DA OBRA

Ficha catalográfica

Amorim, Fernanda Cláudia Miranda

Terapia a laser de baixa intensidade e membrana amniótica humana aplicadas em modelo experimental de queimadura / Fernanda Cláudia Miranda Amorim; orientadora, Profa Dra Emilia Angela Lo Schiavo Arisawa. - São José dos Campos, SP, 2021.

1 CD-ROM, 69 p.

Tese (Doutorado) - Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica.

Inclui referências

1. Engenharia Biomédica. 2. Queimaduras. 3. Terapia a Laser de Baixa Intensidade. 4. Cicatrização de feridas. I. Arisawa, Profa Dra Emilia Angela Lo Schiavo, orient. II. Universidade do Vale do Paraíba. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica. III. Título.

Eu, Fernanda Cláudia Miranda Amorim, autora da obra acima referenciada:

Autorizo a divulgação total ou parcial da obra impressa, digital ou fixada em outro tipo de mídia, bem como, a sua reprodução total ou parcial, devendo o usuário da reprodução atribuir os créditos ao autor da obra, citando a fonte.

Declaro, para todos os fins e efeitos de direito, que o Trabalho foi elaborado respeitando os princípios da moral e da ética e não violou qualquer direito de propriedade intelectual sob pena de responder civil, criminal, ética e profissionalmente por meus atos.

São José dos Campos, 13 de Setembro de 2021.

Fernanda Cláudia M. Amorim

Autora da Obra

Data da defesa 09 de Junho de 2021

FERNANDA CLÁUDIA MIRANDA AMORIM

**"TERAPIA A LASER DE BAIXA INTENSIDADE E MEMBRANA AMNIÓTICA HUMANA
APLICADAS EM MODELO EXPERIMENTAL DE QUEIMADURA."**

Tese aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor, do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba – Univap, pela seguinte banca examinadora:

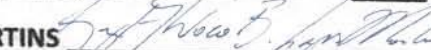
PROF.^ª DR.^ª LUCIANA BARROS SANT'ANNA



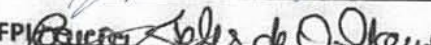
PROF.^ª DR.^ª EMILIA ANGELA LO SCHIAVO ARISAWA



PROF. DR. RODRIGO ALVARO BRANDÃO LOPES MARTINS



PROF. DR. MÁRCIA TELES DE OLIVEIRA GOUVEIA - UFPI



PROF. DR. PAULO JORGE PEREIRA ALVES - UCP



Prof.^ª Dr.^ª Lúcia Vieira

Diretora do IP&D – Univap

São José dos Campos, 09 de junho de 2021.

Dedico esta pesquisa aos meus filhos, Mariana e Mateus, por todo amor e presença divina em minha vida, que com simples gestos me motivam a buscar meus sonhos todos os dias.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, essa força divina que move o mundo, por se fazer presente em todos os instantes em minhas ações.

Ao Centro Universitário UNINOVAFAPI pela concessão do afastamento das minhas atividades docentes para as qualificações.

Aos professores do Doutorado em Engenharia Biomédica pelas contribuições na construção do meu conhecimento.

À professora Dra. Emília Ângela Lo Schiavo Arisawa, pela paciência, dedicação e competência profissional com que orientou esta pesquisa. Obrigada pelos valiosos ensinamentos.

À professora Dra. Luciana Barros Sant'Anna pelas orientações na captação e preparo da Membrana Amniótica Humana, bem como as contribuições nas qualificações e defesa da tese.

Aos professores da banca examinadora Dra. Márcia Teles de Oliveira Gouveia, Dr. Paulo Jorge Pereira Alves, Dr. Rodrigo Álvaro Brandão Lopes Martins e Dr. Mário Oliveira Lima, pelas contribuições e disponibilidade.

Às queridas Adélia Dalva, Juliana Macedo e Ana Beatriz, pelos conhecimentos, apoio, ansiedades, angústias e boas risadas compartilhadas.

Às amigas do doutorado Lízia Daniela, Magda Rogéria e Saraí de Brito Cardoso, pelos conhecimentos, apoio e companhia nas viagens a São José dos Campos.

À professora Dra. Jancineide Oliveira e o funcionário do laboratório Cleiton pela ajuda inestimável no laboratório experimental.

Às funcionárias da UNIVAP Miriam e Diva Borelli pela atenção e delicadeza sempre.

RESUMO

Lesões decorrentes de queimaduras demandam tratamentos complexos, exigem assistência especializada e são responsáveis por altas taxas de morbimortalidade, configurando-se como problema de saúde pública no Brasil e no mundo. As queimaduras de espessura parcial por agentes térmicos são as que ocorrem em maior frequência na população e seu tratamento acarreta custos elevados. Nesse sentido, terapias reconstrutivas, de fácil aplicabilidade, seguras e que considerem custo/efetividade têm sido testadas, tais como a Terapia a Laser de Baixa Intensidade (TLBI) e a aplicação de Membrana Amniótica Humana (MAh), que têm se destacado no contexto da medicina regenerativa. O estudo objetivou avaliar o processo de reparo tecidual em queimaduras experimentais de espessura parcial superficial após aplicação da TLBI e MAh, isoladamente e em associação. A amostra foi composta por quarenta e oito ratos machos *Wistar* submetidos à queimadura de espessura parcial superficial, randomizados em quatro grupos: Controle (C)- não recebeu tratamento; Membrana Amniótica Humana (MAh)- aplicação de fragmento de MAh; Laser de Baixa Intensidade (TLBI)- irradiados com TLBI; Laser de Baixa Intensidade + Membrana Amniótica Humana (TLBI+MAh) – associação das terapias. Foram avaliadas as características histológicas e morfométricas das amostras de pele aos 7º e 14º dias e os resultados foram analisados pelos testes Kolmogorov-Smirnov, Mann Whitney e Kruskal-Wallis test com pós de Dunn's Multiple Comparison Test ($p < 0,05$). A análise histológica mostrou redução no processo inflamatório ($p < 0,0001$) e aumento na proliferação de fibroblastos ($p < 0,0001$), principalmente aos 7 dias, nos grupos que sofreram intervenção comparados ao grupo C. Aos 14 dias, no grupo TLBI+MAh foram observadas espessas e alinhadas fibras de colágeno, demonstrando aceleração do processo cicatricial ($p < 0,0001$). A fotobiomodulação com TLBI agiu sinergicamente com a aplicação tópica da MAh constituindo o protocolo terapêutico mais eficaz para tratamento de queimaduras de espessura parcial superficial utilizado na presente pesquisa. A combinação entre as terapias potencializou os efeitos anti-inflamatórios e de estímulo à proliferação celular, acelerando o processo de reparo tecidual.

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

**LOW INTENSITY LASER THERAPY AND HUMAN AMNIOTIC MEMBRANE
APPLIED IN AN EXPERIMENTAL BURNING MODEL
ABSTRACT**

Burn injuries require complex treatments, require specialized care and are responsible for high morbidity and mortality rates, becoming a public health problem in Brazil and worldwide. Partial thickness burns caused by thermal agents are the most common among the population and their treatment is costly. In this sense, reconstructive therapies that are easy to apply, safe, and that consider cost-effectiveness have been tested, such as Low-Level Light Therapy (LLLT) and the application of Human Amniotic Membrane (MAH), which have stood out in the context of regenerative medicine. The study aimed to evaluate the tissue repair process in experimental superficial partial thickness burns after application of LLLT and MAH, alone and in association. The sample was composed of forty-eight male Wistar rats submitted to partial thickness superficial burns, randomized into four groups: Control (C)- received no treatment; Human Amniotic Membrane (MAH)- application of MAH fragment; Low-Level Light Therapy (LLLT)- irradiated with LLLT; Low-Level Light Therapy + Human Amniotic Membrane (LLLT+MAH) - association of therapies. Histological and morphometric characteristics of the skin samples were evaluated at the 7th and 14th days and the results were analyzed by Kolmogorov-Smirnov, Mann Whitney, and Kruskal-Wallis test with post Dunn's Multiple Comparison Test ($p < 0.05$). Histological analysis showed a reduction in the inflammatory process ($p < 0.0001$) and an increase in fibroblast proliferation ($p < 0.0001$), especially at 7 days, in the groups that underwent intervention compared to group C. At 14 days, thick and aligned collagen fibers were observed in the LLLT+MAH group, demonstrating acceleration of the healing process ($p < 0.0001$). The photobiomodulation with LLLT acted synergistically with the topical application of MAH constituting the most effective therapeutic protocol for treatment of superficial partial thickness burns used in this research. The combination of therapies potentiated the anti-inflammatory effects and stimulated cell proliferation, accelerating the process of tissue repair.

Descriptors: Burns. Wound Healing. Amnion. Low-Level Light Therapy. Rats.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Percentual de áreas queimadas segundo regra dos 9.	20
Figura 2 - Representação gráfica da classificação atual de queimaduras segundo à profundidade.	23
Figura 3 - Fluxograma das etapas dos procedimentos experimentais. Teresina, Piauí, Brasil, 2021.....	34
Figura 4 - Imagens macroscópica das lesões por queimadura de espessura superficial parcial em ratos Wistar nos grupos C, MAh, TLBI e TLBI+MAh, aos sete e quatorze dias (n = 48). Teresina, PI, Brasil, 2021.	40
Figura 5 - Fotomicrografias mostrando alterações histopatológicas em queimaduras de espessura superficial parcial em ratos Wistar nos grupos C, MAh, TLBI e TLBI+MAh aos sete e quatorze dias (n = 48). Teresina, PI, Brasil, 2021.....	41
Figura 6 - Representação gráfica do efeito da fotobiomodulação com TLBI e da membrana amniótica, aplicadas isoladamente ou em associação, na contagem média de células inflamatórias em queimaduras de espessura superficial parcial em ratos Wistar (n = 48). Teresina, PI, Brasil, 2021.	43
Figura 7 - Representação gráfica do efeito da fotobiomodulação com TLBI e da membrana amniótica, aplicadas isoladamente ou em associação, na contagem média de fibroblastos em queimaduras de espessura superficial parcial em ratos Wistar (n = 48). Teresina, PI, Brasil, 2021.	44
Figura 8 - 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, 2021.	45
Figura 9 - 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, 2021.	46

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1: Análise histopatológica intragrupo da média da contagem de células inflamatórias (média \pm erro-padrão) dos grupos C, MAh, TLBI e TLBI+MAh aos 7 e 14 dias após queimaduras por contato de espessura superficial parcial em ratos Wistar (n = 48). Teresina, PI, Brasil. 2021..... 43
- Tabela 2 - Análise histopatológica intragrupo da média da contagem de células inflamatórias (média \pm erro-padrão) após tratamento com MAh, TLBI e TLBI+MAh aos 7 e 14 dias após queimaduras por contato de espessura superficial parcial em ratos Wistar (n = 48). Teresina, PI, Brasil. 2021..... 45

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA.....	15
3	HIPÓTESES.....	17
4	OBJETIVOS	18
4.1	GERAL	18
4.2	ESPECÍFICOS.....	18
5	REFERENCIAL TEMÁTICO	19
5.1	QUEIMADURAS E O PROCESSO CICATRICAL	19
5.2	ATUAIS MÉTODOS DE TRATAMENTO DE QUEIMADURAS	23
5.3	TERAPIA COM LASER DE BAIXA INTENSIDADE (TLBI).....	25
5.4	MEMBRANA AMNIÓTICA HUMANA COMO CURATIVO BIOLÓGICO NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS.....	28
6	MATERIAIS E MÉTODOS	31
6.1	ASPECTOS ÉTICOS LEGAIS	31
6.2	TIPO DE ESTUDO.....	31
6.3	PERÍODO E LOCAL DO ESTUDO	32
6.4	ANIMAIS.....	32
6.5	GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	32
6.6	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	33
6.6.1	Indução da queimadura	34
6.6.2	Coleta e processamento do tecido placentário	35
6.6.3	Aplicação da MAh	36
6.6.4	Fotobiomodulação com TLBI.....	36
6.6.5	Eutanásia dos Animais	37
6.6.6	Técnicas Histológicas.....	37
6.6.7	Avaliações Histológicas e Morfométricas	38
6.6.8	Análise Estatística	38
7	RESULTADOS	40
7.1	ANÁLISE MACROSCÓPICA	40
7.2	ANÁLISE MICROSCÓPICA	41
7.2.1	Células inflamatórias.....	41

7.2.2	Fibroblastos	44
7.2.3	Colágeno	45
8	DISCUSSÃO	47
9	CONCLUSÃO	52
	REFERÊNCIAS.....	53
	APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO .	62
	ANEXO A - ARTIGO PUBLICADO	65
	ANEXO B - ARTIGO SUBMETIDO	66
	ANEXO C - APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA – UNINOVAFAP)	66
	ANEXO D - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP)..	68

1 INTRODUÇÃO

As queimaduras em pele são lesões ocasionadas pelo calor, radiação, radioatividade, eletricidade, fricção ou contato com produtos químicos que determinam níveis variados de perda tecidual, atingindo a pele desde a epiderme, e dependendo do agente causador ou grau da queimadura, pode alcançar camadas mais internas até os órgãos mais profundos. 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 (DE ALENCAR FONSECA SANTOS *et al.*, 2018; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018; ABAZARI *et al.*, 2020).

As lesões decorrentes de queimadura demandam tratamentos complexos, exigem assistência de equipe multiprofissional especializada e apresentam alta taxa de morbimortalidade, sendo consideradas um problema de saúde pública no Brasil e no mundo. Estima-se que ocorram anualmente aproximadamente 1.000.000 ocorrências por queimaduras no Brasil, resultando como consequências em óbitos diretos ou indiretos, em decorrência dessas lesões (BRASIL, 2017a).

O tratamento de queimaduras sempre foi um desafio, tanto pela gravidade quanto pela multiplicidade de complicações que normalmente ocorrem. No entanto, os protocolos clínicos tradicionais empregados no tratamento de queimaduras apresentam custos moderados a altos. Implica não somente em cirurgias de enxertia de pele, mas também no controle e orientação do processo de reparo tecidual, pois este tende a ocorrer de forma desordenada, com potencial formação de sequelas e risco de infecções, implicando assim em maior tempo de hospitalização e conseqüentemente em custo hospitalar elevado (TAVARES; SILVA, 2015).

As queimaduras térmicas podem acontecer por escaldaduras (líquidos quentes), queimaduras de contato (sólidos quentes) ou queimaduras de chamas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018). 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 angiogênese reduzida, inflamação sustentada, estresse oxidativo, aumento da proteólise e septicemia (ZHANG *et al.*, 2010).

As queimaduras de espessura parcial são as que ocorrem com maior frequência na população, sendo classificadas a partir da profundidade na derme em: espessura parcial superficial ou espessura parcial profunda. As queimaduras de espessura parcial superficial são caracterizadas por serem úmidas, dolorosas ao toque, com presença de flictenas, coloração rosácea e esbranquiçadas ao toque; e, as de espessura parcial profundas apresentam xerodermia,

diminuição da sensibilidade a dor, presença de flictenas, avermelhadas, sem alterações de coloração ao toque (LIMA *et al.*, 2016; ADVANCED TRAUMA LIFE SUPPORT, 2018)

Atualmente, os medicamentos mais usados para o tratamento de queimaduras de espessura parcial são sulfadiazina de prata, alginato de prata, hidrogênio e curativos úmidos (WASIAK; CLELAND, 2015). Cabe ressaltar que embora alguns desses fármacos apresentem ação antibactericida, o acúmulo de seus resíduos no tecido pode predispor à infecção local, bem como a oxidação da prata possibilita um efeito tóxico (FERREIRA; PAULA, 2013; GENUINO *et al.*, 2014; GUITTON; GOUVEIA; AZEVEDO, 2014).

Alguns estudos têm avaliado o uso da fotobiomodulação com Laser de Baixa Intensidade (LBI) no tratamento das queimaduras, relatando redução da resposta inflamatória e aumento na proliferação de fibroblastos, osteoblastos e células epiteliais, induzindo a síntese de colágeno e acelerando o reparo tecidual. Esse resultado ocorre pelos efeitos da Terapia a Laser de Baixa Intensidade (TLBI) sobre os diferentes tecidos, destacando-se os efeitos trófico-regenerativos, anti-inflamatórios e analgésicos, os quais têm sido demonstrados em diversos estudos (GAGNON *et al.*, 2016; REGULSKI; DANILKOVITCH; SAUNDERS, 2018; MOSCA *et al.*, 2019; NIFOROUSHADEH *et al.*, 2019; YADAV *et al.*, 2018; CHUNG *et al.*, 2020; ANDRADE *et al.*, 2020).

A Engenharia de Tecidos vem se destacando em terapias celulares para a cicatrização de feridas atendendo às exigências de segurança e eficácia dos tratamentos (HO *et al.*, 2017). Assim, os pesquisadores têm se preocupado em testar tipos variados de substâncias e técnicas terapêuticas que auxiliem o processo de cicatrização. Neste sentido, a Membrana Amniótica humana (MAh) tem sido aplicada na oftalmologia, ortopedia, cicatrização de feridas cirúrgicas, agudas e crônicas (FERNG *et al.*, 2016; HECKMANN; AURAN; MIRZAYAN, 2016; ILIC *et al.*, 2016; SILINI *et al.*, 2017; DHALL *et al.*, 2019; RAZA *et al.*, 2020).

A MAh ou âmnio, camada mais interna da placenta, é constituída por epitélio cúbico simples de revestimento que fica em contato direto com o líquido amniótico. Apresenta espessa membrana basal, formada basicamente de colágeno tipo IV e laminina, bem como uma matriz estromal avascular composta por tecido conjuntivo frouxo e por fibroblastos (BOURNE, 1962; NIKNEJAD *et al.*, 2008).

Essas considerações incentivaram o desenvolvimento da presente pesquisa, envolvendo a MAh e sua aplicação, isoladamente ou em associação à TLBI, no tratamento de queimaduras de espessura parcial superficial em ratos. Espera-se que este estudo possa contribuir para o avanço do conhecimento na área de Engenharia de Tecidos bem como para novos protocolos de tratamento em queimaduras.

2 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

O custo financeiro para tratamento de queimaduras é bastante elevado para os familiares e para o sistema de saúde, e ainda requer cuidados intensivos de equipe multiprofissional habilitada nessa área. Além das diversas coberturas disponíveis no mercado, é importante a pesquisa de novas opções, com o objetivo de melhorar o custo/benefício ao paciente e ao sistema público de saúde.

Na busca para acelerar o reparo tecidual das feridas, desde a pré-história o homem utiliza os mais diversos materiais para suas coberturas, como extratos de vegetais, lama e mel. Não existem evidências de um produto que possa ser utilizado durante todo o processo de reparo tissular, principalmente em feridas nas quais outros fatores podem interferir em sua evolução, como a dimensão, a profundidade, o grau de infecção, a presença de secreções, hematoma, necrose, corpo estranho e fatores locais (GUIMARÃES, 2011).

Atualmente, as disponibilidades terapêuticas para tratamento de queimaduras ainda apresentam sucesso limitado e incentivam a pesquisa para o desenvolvimento de novas terapêuticas eficazes. No Brasil, observa-se, por meio da busca eletrônica em banco de dados, a escassez de publicações na área de terapias avançadas em tratamento de queimaduras.

A MAh possui algumas características peculiares, como efeito antiadesivo, barreira antimicrobiana, redução da inflamação, proteção do leito da ferida e indução da reepitelização, por facilitar a adesão e a migração das células epiteliais basais.

A MAh é considerada um biomaterial utilizado para cobertura primária, que apresenta componentes teciduais próximos aos observados na pele. Presume-se que sua aplicação no leito da ferida induzirá redução no tempo de reparo tissular, possibilitando um processo de reparo tecidual mais rápido, com menos tempo de hospitalização e diminuição no custo para o paciente e o Sistema de Saúde.

A TLBI possui vantagens como método não farmacológico e não invasivo, com índice baixo de efeito colateral e bom custo/benefício. Esta terapia evidencia a aceleração no processo de reparo tecidual, devido aumento da atividade celular, proliferação de fibroblastos, modulação da produção dos fatores de crescimento e diminuição da resposta inflamatória.

A TLBI será aplicada como adjuvante na terapia avançada com MAh. Com essa associação, busca-se otimização do tempo de reparo tecidual, visto que a energia liberada pela terapia penetra profundamente nos tecidos, ativando o metabolismo celular. A TLBI é um método relativamente barato, e eficaz no processo de reparo de tecidos.

As lesões cutâneas impactam a saúde pública e necessitam de constantes pesquisas para

o seu aprimoramento. A prevalência de feridas com retardo no processo de cicatrização, em instituições hospitalares e ambulatoriais, possui incidência elevada, acarretando elevados custos, prejuízos ao exercício profissional e na qualidade de vida dos indivíduos afetados.

Adicionalmente, a membrana amniótica, é um tecido descartado após o parto, de fácil obtenção, disponível em elevada quantidade, e cuja coleta não envolve qualquer procedimento invasivo. O uso desse biomaterial não provoca conflitos éticos ou religiosos, além de ser uma alternativa mais econômica, quando comparado ao isolamento de células tronco, que requer processos mais complexos.

A utilização da MAh como curativo biológico, ainda possui um número reduzido de estudos que analisem sua aplicabilidade no reparo tecidual em animais, e até o momento, nenhum estudo comparou a eficácia da interação da MAh e a TLBI auxiliando a cicatrização de feridas.

3 HIPÓTESES

H₁ = O uso da TLBI potencializa o reparo tecidual de queimadura parcial superficial.

H₂ = O uso da MAh potencializa o reparo tecidual de queimadura parcial superficial.

H₃ = O uso da TLBI em associação com a MAh potencializa o reparo tecidual de queimadura parcial superficial mais que o uso isolado da TLBI ou da MAh.

4 OBJETIVOS

4.1 GERAL

Avaliar o processo de reparo tecidual em queimaduras experimentais de espessura parcial superficial após aplicação da TLBI e MAh, isoladamente e em associação.

4.2 ESPECÍFICOS

- Observar aspectos macroscópicos como alteração na coloração da pele, flictenas e presença de crosta;
- Identificar aspectos microscópicos qualitativos quanto ao infiltrado inflamatório, fibroblastos, vasos sanguíneos, edema e organização das fibras colágenas;
- Quantificar as células inflamatórias e fibroblastos presentes;
- Identificar e quantificar as fibras colágenas dos tipos I e III;
- Comparar os dados obtidos após o término dos protocolos terapêuticos estudados indicando o que apresentou maior eficácia no processo de reparo tecidual.

5 REFERENCIAL TEMÁTICO

5.1 QUEIMADURAS E O PROCESSO CICATRICAL

Historicamente, nos escritos egípcios 1500 a.C, já havia relatos de lesões por queimaduras, tratamento e a preocupação com o alívio da dor. Os avanços do tratamento das queimaduras evoluíram ao longo dos séculos evidenciando preocupação contínua do homem com esse agravo (COUTINHO, 2014).

As queimaduras são lesões na pele oriundas de traumas por agentes térmicos, químicos, elétricos ou radioativos, causando destruição dos tecidos nos mais variados graus de intensidade (SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUEIMADURA, 2012).

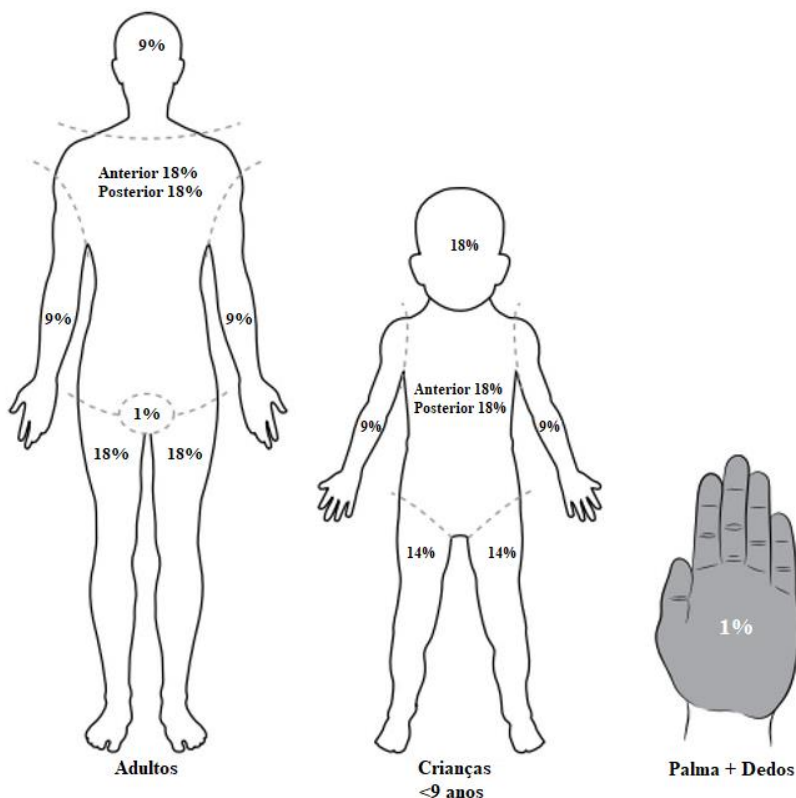
Estudos evidenciam que 75% dos acidentes com queimaduras ocorrem no próprio domicílio envolvendo, principalmente, crianças e idosos, e tendo como agentes causais água fervente e álcool (CARDOSO; ORGAES; GONELLA, 2012).

As queimaduras podem ser classificadas de acordo com a profundidade da lesão em primeiro, segundo e terceiro grau. De acordo com a extensão da queimadura na superfície corporal estima-se o agravo a partir dos métodos da palma, de Lund e Browder e regra dos nove (SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUEIMADURA, 2012).

As queimaduras de primeiro grau atingem a epiderme e causam sinais e sintomas clínicos como hiperemia, edema e dor. A pele descama entre quatro e seis dias, com a reconstrução total ocorrendo entre 45 e 75 dias. Nas queimaduras de segundo grau são afetadas a epiderme e parte da derme, há formação de flictenas, que podem ser superficiais e profundas, com a restauração da pele acontecendo entre 7 e 21 dias. As de terceiro grau acometem todas as camadas da pele, a lesão é indolor devido à destruição das fibras nervosas, e a pele geralmente apresenta coloração esbranquiçada ou enegrecida, sem reepitelização, sendo assim necessário a enxertia de pele (CARTAXO, 2014).

Relacionado à extensão das queimaduras, o método de avaliação mais utilizado na prática assistencial é a regra dos nove. Neste método o corpo é dividido em áreas múltiplas de 9%, e em seguida somam-se as áreas afetadas, atribuindo-se valores nas partes do corpo em adultos e crianças (Figura 1) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013).

Figura 1 - Percentual de áreas queimadas segundo regra dos 9.



Fonte: World Health Organization (2013).

As alterações fisiológicas e fisiopatológicas que ocorrem nas queimaduras dependem da profundidade e da extensão da área queimada, assim as que não excedem a 25% da superfície corporal queimada total produzem resposta local do organismo, enquanto as que superam os 25% podem gerar resposta local e sistêmica, sendo assim consideradas como queimadura importante (SMELTZER *et al.*, 2011).

A infecção é uma das complicações mais frequentes que acomete o paciente queimado, sendo uma das principais causas de morbimortalidade do grande queimado. Além de agravar a lesão e aumentar sua profundidade, ocasiona também retardo na cicatrização, agravamento da dor e prolongamento do tempo de hospitalização (CARTAXO, 2014).

De acordo com Franco e Gonçalves (2008), as fases do processo cicatricial são comuns a qualquer ferida, sem levar em consideração sua causa e surgimento. Portanto, consiste em processo dinâmico e sistêmico e está diretamente relacionado às condições gerais do organismo, desenvolvendo-se de acordo com a individualidade funcional de cada paciente.

Segundo Campos; Borges-Branco; Groth (2007) e Irion (2015), os mecanismos da cicatrização de feridas possuem uma sequência programada de eventos que consiste em uma coordenada cascata de eventos celulares, moleculares e bioquímicos que interagem para que

ocorra a reconstituição tissular.

Irion (2015) descreve seis etapas de regeneração normal das feridas por segunda intenção. A primeira é ativação da hemostasia, seguida de ativação da inflamação, após reepitelização, formação de tecido de granulação, contração e por fim remodelação.

Por outro lado, alguns autores referem que o processo de reparo tecidual ocorre em três fases: inflamação, proliferação e regeneração. Conforme Santuzzi *et al.* (2011), a identificação das fases normais da cicatrização na pele permite a intervenção, quando necessária, de um profissional habilitado. Tamama e Kerpedjieva (2011) afirmam que quaisquer interferências em uma dessas fases acarretam na formação de uma ferida crônica.

As feridas têm fechamento de suas bordas por primeira intenção, por segunda e terceira intenções, ou primário tardio. Segundo Iron (2015) e Kifer (2013), a primeira intenção pode ser obtida por adesivos, grampos, suturas, fita ou cola, utilizadas em feridas cirúrgicas ou traumáticas com bordas regulares e limpas, com perda mínima de tecido subcutâneo.

Segundo Kifer (2013), as feridas de segunda intenção cicatrizam por formação inicial do tecido de granulação, com posterior retração local do tecido neoformado, considerando que não há possibilidade de união das bordas da lesão sem causar deformidades. São exemplos dessas feridas crônicas as úlceras por pressão, insuficiência venosa, arteriais e diabéticas.

Conforme Hernández; Cano; Soria (2014), nas feridas por segunda intenção as bordas não são suturadas, possuem a fase de inflamação prolongada, são mais profundas, com expressiva perda de tecidos, sendo, assim, consideradas como potencialmente suscetíveis a processo infecciosos. As fases do processo de cicatrização evoluem lentamente em semanas, meses e anos, e seu fechamento ocorre espontaneamente.

De acordo com Irion (2015), o fechamento da ferida por primeira intenção tardia consiste em deixar a lesão aberta para fechamento adequado e se desenvolve com a formação de tecido de granulação e contração que depende do volume de tecido perdido em decorrência de necrose.

Guimarães (2011) cita que na ocorrência de uma ferida aguda, a fase inflamatória se inicia de imediato após a lesão, ocorrendo a liberação de substâncias vasoconstritoras que atuam provocando agregação de plaquetas e ativação da cascata de coagulação que auxiliarão no processo de hemostasia do local lesionado.

Quando ocorre a lesão tissular, as plaquetas são ativadas pelo colágeno e trombina, ocorrendo a liberação do Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF). Este fator estimula a liberação de outros fatores do crescimento, como fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e fator de crescimento de fibroblastos básicos (bFGF) (IRION, 2015). Estes

fatores de crescimento, também chamados de sinalizadores moleculares, estão presentes em diversos tecidos, principalmente nas fases de remodelação ou reparação, apresentando papel fundamental nos processos de proliferação celular, diferenciação, quimiotaxia e formação de matriz extracelular (IRION, 2015).

Campos; Borges-Branco; Groth (2007), referem que os neutrófilos são atraídos por substâncias quimiotáticas liberadas por plaquetas, e produzem radicais livres que auxiliam na destruição bacteriana e são gradativamente substituídos por macrófagos. Os macrófagos auxiliam na degradação do tecido desvitalizado e são essenciais tanto para a iniciação da formação, quanto para propagação do tecido de granulação. Além disso, a destruição tecidual leva a ativação da via do ácido araquidônico, dando origem a prostaglandinas (PG), leucotrienos e diversos quimioatrativos. Esse processo se amplia induzindo a proliferação celular, estimulada por fatores de crescimento, como PDGF, bFGF, fator de crescimento tumoral (TNF) e fator de crescimento transformante beta (TGF- β), para reparar a lesão tecidual. A transição da fase inflamatória para a fase proliferativa depende da atividade dos macrófagos na retirada dos restos teciduais e celulares da área e liberação de fatores de crescimento (IRION, 2015).

A fase de proliferação é subdividida em quatro etapas fundamentais que são: epitelização, angiogênese, formação de tecido de granulação e deposição de colágeno. Essa fase tem início normalmente entre o terceiro e quarto dias após o surgimento da lesão e se prolonga até meados do término da segunda semana. Em sequência ocorre o restabelecimento inicial da pele, que será preparada para o total fechamento da lesão e conclusão do processo cicatricial. Esta fase é caracterizada por migração de fibroblastos, deposição da matriz celular e formação abundante de tecido de granulação. O TGF- β é liberado no início por plaquetas e macrófagos que aumentam de forma geral a produção de componentes da matriz, incluindo colágeno, proteoglicanos e fibronectinas (FRANCO; GONÇALVES, 2008).

De acordo com Guimarães (2011), em torno do quinto dia é possível observar que a ferida aguda tem cor rosada e as bordas da ferida começam a se aproximar. Portanto, não há mais dor, com formação de novos capilares e migração de células epiteliais para o centro da lesão. Para Irion (2015), ocorre a proliferação de fibroblastos e produção de fibras de colágeno e, conseqüentemente, a proliferação de angioblastos e angiogênese.

A angiogênese é estimulada pelo fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), e é caracterizada pela migração de células endoteliais e formação de capilares essenciais para a reparação adequada (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007). Tal fase restaura o fornecimento de sangue para as feridas isquêmicas e promove a reparação da ferida (TAMAMA; KERPEDJIEVA, 2011).

A fase de maturação ou remodelação é a fase final da cicatrização das feridas. Essa fase pode durar de 1 a 2 anos, ou até mais tempo. A remodelação de ferida aguda visa a manter um equilíbrio entre degradação e síntese, resultando remodelação de espessos feixes de fibras colágenas, ácido hialurônico e fibronectina, pela degradação desses componentes. A resistência de tensão da ferida aumenta progressivamente, em paralelo com a deposição de colágeno (IRION, 2015).

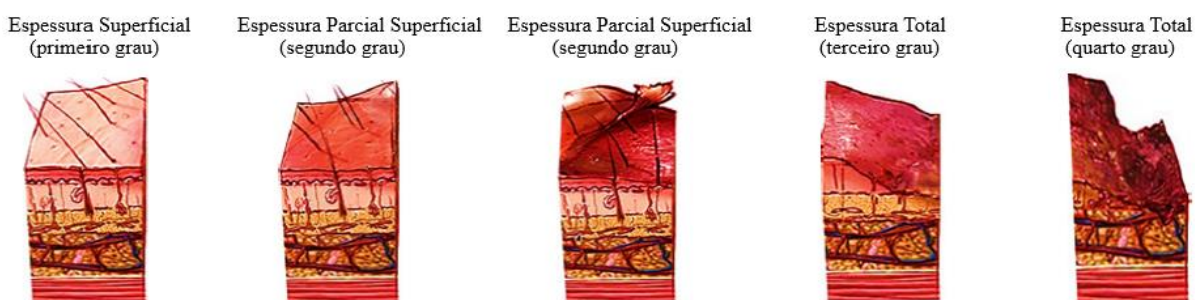
A compreensão das fases de reparo tecidual permite a identificação de uma cicatrização normal da pele e o reconhecimento de quando uma intervenção é necessária para aplicação de terapia adjuvante que seja coerente (SANTUZZI *et al.*, 2011). Para Dinni e Romanelli (2014) a avaliação clínica da ferida é essencial para o tratamento, e consiste na organização de um plano de cuidados, escolha e acompanhamento adequado do tratamento e estabelecimento de previsão para o tempo de cicatrização.

5.2 ATUAIS MÉTODOS DE TRATAMENTO DE QUEIMADURAS

O tratamento de queimaduras sempre foi um desafio, tanto pela sua gravidade, como pela multiplicidade de complicações que normalmente ocorrem. A cura da queimadura implica não somente em cirurgias de enxertia de pele precoces, mas também em controlar e orientar a regeneração cicatricial, que tende a ocorrer de forma desorganizada e com grande risco para infecção e sequelas.

A classificação das queimaduras é muito importante para o manejo, diagnóstico e escolha do tratamento correto. Nesse sentido, um amplo estudo de revisão reuniu as principais informações de publicações científicas sobre as diversas classificações e parâmetros de avaliação em queimaduras, identificando entre eles as principais denominações atribuídas às queimaduras quanto ao grau de profundidade dessas lesões (Figura 2) (ABAZARI *et al.*, 2020).

Figura 2 - Representação gráfica da classificação atual de queimaduras segundo à profundidade.



Fonte: Abazari *et al.* (2020).

As falhas mais importantes do reparo ocorrem em estágios iniciais, levando à diminuição dos elementos celulares e alterações na síntese de colágeno. Diversos fatores locais e sistêmicos interferem e retardam a cicatrização e, por isso, a reparação tecidual tem merecido atenção em vários estudos, em busca de métodos terapêuticos que possam solucionar ou minimizar as falhas no processo (CARVALHO *et al.*, 2003).

Para Cartaxo *et al.*, (2014) vários aspectos devem ser considerados na assistência a pessoa vítima de queimadura, como: o atendimento imediato após a queimadura, o tratamento pré-hospitalar e o tratamento hospitalar, o qual deve se basear em reposição volêmica, suporte nutricional, controle dos sinais vitais e da dor, profilaxia do tétano, higiene corporal e curativos.

Para escolha do tratamento das feridas causadas por queimaduras devem ser considerados, como critérios, a profundidade da lesão, os tecidos acometidos e sua evolução. Assim, para queimaduras superficiais não muito extensas é indicado uso local de creme hidratante. Geralmente essas lesões evoluem sem cicatriz, no entanto podem resultar na descoloração permanente da pele queimada (CARTAXO *et al.*, 2014).

Nas queimaduras parciais e totais é frequentemente utilizada a Sulfadiazina de Prata (1%), produto de fácil aplicação e disponível na maioria dos serviços hospitalares. A aplicação do produto deve ser feita duas vezes ao dia, devido ao efeito oxidativo da prata, o que às vezes limita o seu uso, devido ao custo/benefício, principalmente nos curativos oclusivos ou muito extensos. Outro aspecto a ser considerado, é que todo o produto deve ser retirado antes da próxima aplicação, o que pode ocasionar a retirada do novo tecido formado ou o tecido de granulação (GUITTON; GOUVEIA; AZEVEDO, 2014).

O efeito terapêutico da Sulfadiazina de prata ocorre por meio do íon de prata, que causa a precipitação de proteínas e age diretamente na membrana citoplasmática da célula bacteriana, exercendo ação bactericida imediata, e ação bacteriostática residual, pela liberação de pequenas quantidades de prata iônica. Para sua aplicação alguns cuidados devem ser considerados como lavar a ferida, aplicar a pomada assepticamente, em toda extensão da lesão, seguida da aplicação de gaze de contato, úmida, e cobertura da área com curativo estéril. Outro cuidado importante, está relacionado à periodicidade de troca, a qual deve ser feita no máximo a cada 12 horas ou quando a cobertura secundária estiver saturada. No momento da troca, a área coberta com a pomada pode apresentar aspecto purulento devido à oxidação, sem que isso represente infecção real, entretanto se faz necessário a remoção total do excesso de pomada e do tecido desvitalizado (FRANCO; GONÇALVES, 2008).

Outros produtos tópicos são citados na literatura como integrantes no tratamento de queimaduras como colagenases, nitrofurazona, pomadas a base de antibióticos e vaselina.

Também são citados curativos biológicos originados de tecidos naturais como exemplo aloenxertos cutâneos, enxertos de pele, substitutos de pele sintéticos e membrana amniótica (BOLGIANI; SERRA, 2010; CARTAXO *et al.*, 2014).

Com relação à fotobiomodulação, a revisão de artigos científicos publicada por Andrade, Lima e Albuquerque (2010) sobre os efeitos, mecanismo de ação e parâmetros de aplicação do laser terapêutico na cicatrização de queimaduras, evidenciou que TLBI acelera a proliferação das células reparativas e aumenta a organização do colágeno. Os autores referem que o tratamento de queimaduras com uso de laser pode ser um recurso valioso, visto sua capacidade de induzir cicatrização rápida e organizada. Referem, porém, que há carência de estudos utilizando queimaduras como modelo experimental, além de falta de padronização dos parâmetros relacionados à tipo de queimadura e aplicação do laser.

O grande avanço nas pesquisas relacionadas ao tratamento de feridas nas mais diversas formas e complexidades tem acompanhado a evolução tecnológica, como exemplo a medicina regenerativa e sua aplicabilidade para a cicatrização de feridas. Assim, Gurtner e Chapman (2016) discutem aspectos relevantes da cicatrização de feridas e da evolução da medicina regenerativa, como a utilização da engenharia genética, o acompanhamento da evolução do paciente por meio do prontuário eletrônico e a importância do conhecimento científico sobre a fisiopatologia das feridas, bem como a divulgação das experiências bem sucedidas nas diversas áreas e especialidades da medicina

5.3 TERAPIA COM LASER DE BAIXA INTENSIDADE (TLBI)

O termo Laser é originário da junção das palavras em inglês *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*, e classifica-se em baixa intensidade e alta intensidade. A utilização do laser consiste na emissão de uma luz ampliada, monocromática e intensa, estimulada por radiação. Tem sido muito usado em várias áreas como Biomedicina, Enfermagem, Engenharia, Fisioterapia, Medicina humana, Odontologia e Medicina Veterinária, com objetivo de modular a resposta inflamatória e acelerar o processo de reparo tecidual (SANTUZZI *et al.*, 2011; ANDRADE; CLARK; FERREIRA, 2014).

De acordo com os protocolos de irradiação, o laser pode ser definido com relação à sua utilização, considerando potência, dose, tempo de irradiação, modo e número de aplicações (ANDRADE; CLARK; FERREIRA, 2014).

A TLBI é uma tecnologia que tem demonstrado efeitos positivos no estímulo da atividade de células envolvidas no processo de cicatrização de feridas. A ação do laser se baseia

na absorção de luz pelos tecidos, modificando o metabolismo celular (MARTINS *et al.*, 2015).

Os lasers de baixa intensidade são geralmente utilizados em aplicações para reparo tecidual, tais como traumatismos musculares, nervosos, ósseos, articulares e cutâneos. Observa-se, com TLBI, ativação dos macrófagos e aumento na proliferação dos linfócitos, aumentando a fagocitose, elevando a secreção de fatores de crescimento de fibroblasto e intensificando a reabsorção tanto de fibrina quanto de colágeno. Essa ação contribui para elevar a quantidade de tecido de granulação e redução da área de ferida cutânea, tanto em humanos quanto em animais (ANDRADE; CLARK; FERREIRA, 2014).

Segundo Martins *et al.*, (2015), estudos têm demonstrado que o estímulo da luz de laser favorece a troca de cálcio por meio da membrana celular, causando alterações transitórias no nível de cálcio citoplasmático, auxiliando a síntese de proteínas reguladoras. Essas modificações contribuem para o estímulo de proliferação de células que são benéficas para o restabelecimento do tecido conjuntivo durante a reparação tecidual e cicatrização de feridas.

TLBI induz à proliferação da linhagem de células importantes para cicatrização e regeneração dos tecidos: fibroblastos, queratinócitos e osteoblastos, dentre outros. Também ativa a liberação de vários fatores de crescimento e citosinas, que são associados à biomodulação do processo inflamatório (BALE; ROY; MEALS, 2010; PIVA *et al.*, 2011).

De acordo com Bale; Roy; Meals (2010), o uso da terapia a laser de baixa intensidade tem como vantagens e atrativo como escolha terapêutica o fato de sua aplicação ser indolor, não invasiva e possuir boa relação custo/benefício.

Em estudo realizado utilizando a TLBI na cicatrização de feridas operatórias utilizando ratos como testes, foram calculados os efeitos de força de ruptura da ferida após as irradiações, empregando dois protocolos distintos, com 8,5 mW e 17,0 mW, tempo de 15 segundos, distância de 10 mm. Constatou-se que em um teste de comparação múltipla, a força média de ruptura da ferida operatória dos grupos de irradiação de 8,5 mW, em dias alternados foi significativamente maior ($p < 0,05$) do que a do grupo de não irradiado. Nesse estudo, nos grupos que foi empregada a irradiação de 17,0 mW foi significativamente maior do que a do grupo não irradiado ($p < 0,01$) (YASUKAWA *et al.*, 2007).

Em outro estudo com camundongos, foi realizada ferida incisional de 1cm em todos os animais e, após sutura, foi irradiada com potência de pico de 5 mW, potência média de saída de 0,5 a 3,5 mW e aplicação por fibra ótica. O protocolo apresentou dose de irradiação de 4J/cm², por 12 s, em cada uma das aplicações nos grupos Laser e terapia conjugada. A primeira aplicação ocorreu após a cirurgia e em dias subsequentes, totalizando três dias. Os autores relataram que os grupos de feridas tratadas com laser apresentavam acelerado processo de

reparo, mostrando restabelecimento morfofuncional tecidual, exibindo cicatriz delineada com bordos bem evidentes e porção central com pequeno desnível, além do aumento expressivo da reepitelização. O grupo com terapia conjugada evidenciou adiantada contração da ferida incisional e melhor organização do botão cicatricial, com aparente aceleração do processo de reparo compatível com sétimo a nono dia de pós-operatório (SANTUZZI *et al.*, 2011).

A laserterapia com emissão de comprimento de onda apropriado pode penetrar na pele, ativando fotorreceptores específicos para induzir processos de cura biológica em tecidos mais profundos, pela ativação de uma variedade de fatores de crescimento, síntese de ATP e colágeno. Apesar de todos esses efeitos do uso do laser, o comprimento de onda ideal e duração da terapia ainda são objeto de inúmeras pesquisas (BALE; ROY; MEALS, 2010).

Segundo Piva *et al.*, (2011), “a dose pode ser definida como a quantidade de radiação oferecida ao tecido”. Portanto, a dose ideal deve ser baseada em estudos de sucesso realizados em laboratórios, definindo-se a dose de acordo com o tecido a ser irradiado, tempo de irradiação e tamanho da área lesada.

Andrade; Clark; Ferreira (2014), em estudo de revisão científica sobre os efeitos do laser de baixa potência na cicatrização de feridas constataram que as doses entre 3-6 J/cm² parecem ser mais eficazes e que doses acima de 10 J/cm², associadas a efeitos nocivos no processo cicatricial. Comprimentos de onda compreendidos entre 632,8 - 1000 nm apresentam com resultados excelentes no processo de cicatrização tissular.

Busnardo e Biondo-Simões (2010) utilizaram o He-Ne com energia de 4J/cm² aplicado 12 segundos por ponto da ferida no modo contínuo, 5 mW, com comprimento de onda de 632,8 nm e área de raio do laser de 0,015 cm². A partir destes parâmetros obtiveram como resultado aumento no colágeno tipo III, resolução precoce da fase inflamatória das feridas e diminuição do exsudato inflamatório.

A profundidade de penetração da TLBI no tecido humano é influenciada pela potência e pelo comprimento de onda, bem como as características biológicas do tecido, como quantidade de melanina presente e cicatrizações anteriores (BALE; ROY; MEALS, 2010).

A TLBI possui efeitos semelhantes às medicações anti-inflamatórias não esteroidais (AINEs) devido à inibição na concentração de prostaglandina E2, ciclo-oxigenase 2 e histamina, com alteração na produção de citocinas inflamatórias e aumento do fluxo sanguíneo local, promovendo a liberação e remoção de substâncias relacionadas à dor (PIVA *et al.*, 2011).

5.4 MEMBRANA AMNIÓTICA HUMANA COMO CURATIVO BIOLÓGICO NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS

Produtos avançados, tal como equivalentes à pele humana e fatores de crescimento recombinantes tópicos foram estudados de forma geral para redução de custos e prevenção de amputação de membros. Dessa maneira, a membrana amniótica é mostrada como um método que auxilia no processo de reparação, atuando como uma membrana basal transplantada que age como substrato para epitelização (GIBBONS, 2015).

Em feridas cirúrgicas limpas, a propriedade hemostática da MAh evita a formação de hematoma, reduzindo o acúmulo microbiano e, assim, o risco de infecção (BARADARAN-RAFFI *et al.*, 2008).

Os mais recentes avanços em terapia de cuidados com feridas são as terapias com células-tronco, primeiramente derivadas da medula óssea e, mais recentemente, as células-tronco derivadas de placenta. Ambas são consideradas como fontes de células estaminais adultas e linhagem de células derivadas de células tronco mesenquimais - MSCs (FRYKBERG; BANKS, 2015).

As células-tronco mesenquimais são multipotentes, capazes de se diferenciar em diversos tecidos de conexão, tais como osso, cartilagem, gordura e tendões (FRYKBERG; BANKS, 2015; HAN; SOUZA; CARVALHO, 2011). As células-tronco derivadas da placenta facilitam a não ocorrência de rejeição no hospedeiro. Em vista disso, a possibilidade de ocorrer a resposta enxerto *versus* hospedeiro se encontra reduzida, quando comparado às células da medula óssea. Elas possuem baixa imunorreatividade por serem células imunologicamente imaturas, e apresentam reduzida possibilidade de transmissão de doenças infecciosas por vírus latentes (HAN; SOUZA; CARVALHO, 2011).

A MAh se apresenta como candidata a uma possível fonte de células-tronco/progenitoras. Células isoladas a partir dessa membrana têm um fenótipo de células estaminais: células epiteliais amnióticas humanas expressam marcadores de células estaminais pluripotentes e são capazes de se diferenciarem *in vitro* para os tecidos de todas as três camadas germinais. A MAh também apresenta células estromais, como células mesenquimais, que têm a capacidade de se diferenciar em células das linhagens mesodérmicas, bem como para tecidos das camadas ectodérmica e endoderme (PAROLINI *et al.*, 2008).

O âmnio é uma membrana originada do saco amniótico que circunda e protege o embrião. A membrana amniótica é um tecido de origem fetal, composta por três camadas: uma única camada epitelial, uma espessa membrana basal e um mesenquima avascular. Não contém

nervos, músculos ou vasos linfáticos, e pode ser separada facilmente do córion subjacente (SHAH; SOWMYA; MEHTA, 2014).

A membrana basal é espessa, formada basicamente de colágeno tipo IV e laminina, possuindo uma matriz estromal avascular composta por tecido conjuntivo frouxo e por fibroblastos (BOURNE, 1962; NIKNEJAD *et al.*, 2008).

Com o desenvolvimento dos processos de armazenamento tecnológico, a membrana placentária tem encontrado aplicação em vários campos da medicina, incluindo o manejo de queimaduras, reconstrução da cavidade oral, bexiga e vagina, timpanoplastia, artroplastia, e outros procedimentos (SHAH; SOWMYA; MEHTA, 2014).

Sant'Anna *et al.*, (2011), desenvolveram estudo experimental para avaliar os benefícios da MAh na regeneração da fibrose e cirrose biliar em ratos, os resultados mostraram redução na gravidade da fibrose induzida pela ligação do ducto biliar em ratos. Nos animais que receberam a MAh a área fibrótica ficou restrita e sem sinais de cirrose. Porém, isso não se manifestou nos ratos do grupo controle, observando-se progressão da fibrose, com conseqüente evolução para cirrose hepática.

As células-tronco presentes na matriz celular da membrana têm a capacidade de efetuar a reparação cutânea e sintetizar fatores de crescimento essenciais e citocinas que promovem migração celular, proliferação e atividade metabólica em células e tecidos (FRYKBERG; BANKS, 2015).

MSCs têm um papel na atividade inflamatória, proliferativa e na fase de remodelação na reparação de feridas. Durante a fase de modelação, a mesma produz fatores de crescimento, tais como TGF- β 3, para limitar cicatriz excessiva, bem como modular o equilíbrio entre a metaloproteinases da matriz e inibidores de tecido de metaloproteinases, enquanto regulam a deposição de colágeno (FRYKBERG; BANKS, 2015).

As MSCs têm seu benefício comprovado em estudos clínicos relatados com uma variedade de animais, especialmente no sucesso em tratamento de feridas crônicas e estimulação do processo cicatricial (GIBBONS, 2015).

A terapia com membrana amniótica é uma promessa na medicina para ferida crônica, pois reverte o processo de reparo tissular e promove a cicatrização. Uma vez que a membrana possui propriedades anti-inflamatórias e imune modeladoras que promovem a cicatrização, e após colocada na ferida, cria um ambiente úmido importante para a cicatrização (TAMAMA; KERPEDIJEVA, 2011; GIBBONS, 2015).

De acordo com Han; Souza; Carvalho (2011), algumas vantagens são apontadas no uso da terapia com MAh, tais como as células podem crescer em meio de cultura, evitando questões

éticas e logísticas; a criopreservação não afeta a possibilidade de proliferação e diferenciação, mesmo se estocada por até 4 anos; potencial de expansão maiores que as células-tronco da medula óssea; potencial de miogênese e angiogênese relevante para o reparo miocárdico.

Muitos estudos são relatados utilizando a terapia com MAh, trabalhos com culturas *in vitro* e em animais como ratos e coelhos. Observa-se, cientificamente, por meio de pesquisas realizadas, que a MAh tem um excelente potencial terapêutico, devido a suas propriedades regenerativas em todo sistema tegumentar, circulatório, digestivo e músculoesquelético. Acredita-se que o uso MAh em feridas agudas e crônicas, bem como em queimaduras possibilite a redução dos custos com tratamento de feridas, o tempo de internação hospitalar e dependência de cuidado.

6 MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 ASPECTOS ÉTICOS LEGAIS

Pesquisa experimental quantitativa aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Centro Universitário - UNINOVAFAPI sob nº 005P/V2/2017 (ANEXO C), obedeceu as Normas Internacionais para a Pesquisa Biomédica em Animais, cumprindo todas as exigências de conforto e bem estar dos animais e respeitando os princípios éticos em experimentação animal, preconizados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), conforme a Lei Federal nº 11.794/08 que estabelece procedimentos para o uso científico de animais (BRASIL, 2008).

Ressalta-se que em relação ao conforto e bem-estar dos animais foram considerados: aclimação (15 dias), dieta adequada (Labina), alojamento em gaiolas de polipropileno, ambiente controlado (claro/escuro 12h, temperatura 20 ± 2 °C) e com ração e água *ad libitum*.

Para a utilização da MAh, a pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Vale do Paraíba - UNIVAP parecer nº 2.077.418 (ANEXO D) e foram considerados os preceitos éticos que envolvem a pesquisa em seres humanos estabelecidos pela Resolução 446/2012 do Conselho Nacional de Saúde. As gestantes participantes da pesquisa foram orientadas quanto à pesquisa e em seguida concordaram em participar assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE (APÊNDICE) (BRASIL, 2012).

6.2 TIPO DE ESTUDO

Trata-se de uma pesquisa experimental de abordagem quantitativa. Os estudos experimentais consistem na investigação na qual o objetivo principal é a relação de causa e efeito, deve ter como parâmetro um grupo controle e outro experimental e controlar o máximo de fatores pertinentes para o que se deseja alcançar (LAKATOS; MARCONI, 2019).

Segundo Polit e Beck (2011) a pesquisa experimental é induzida pelos investigadores por meio de uma intervenção ou tratamento que pode ser chamado de teste controle ou teste clínico com a finalidade de testar se a intervenção causou mudanças na variável dependente.

As pesquisas quantitativas caracterizam-se pelo emprego da quantificação dos dados por meio de técnicas estatísticas e precisão dos resultados, evitando erros sobre o objeto investigado e garantindo segurança nos resultados (RICHARDSON, 2015).

6.3 PERÍODO E LOCAL DO ESTUDO

A coleta dos dados foi realizada nos meses de dezembro de 2018 a março de 2019, nos laboratórios de cirurgia experimental (indução da queimadura nos animais) e histologia (preparo da MAh) do Centro Universitário UNINOVAFAPI, instituição de ensino superior privada credenciada pela portaria MEC nº 1.130 de 11/09/2012 localizada no município de Teresina, Piauí, Brasil. As placentas foram captadas em uma maternidade pública de referência do estado do Piauí, Brasil.

6.4 ANIMAIS

6.4.1 Critérios de seleção

O experimento foi realizado com ratos *Wistar (Rattus norvegicus albinus)*, machos, adultos jovens (8 semanas), massa corporal 250 ± 300 g, mantidos individualmente em gaiolas de polipropileno sob condições assépticas, alimentação específica contendo ração e água *ad libitum*, em condições controladas de temperatura (22 ± 2 °C), com iluminação por lâmpadas fluorescentes em fotoperíodo de 12 h de claro por 12 h de escuro. Os animais foram mantidos no biotério em sistema convencional de gaiolas abertas individuais.

6.4.2 Definição da amostra

A amostra foi composta por 48 ratos *Wistar (Rattus norvegicus albinus)*. Os animais foram randomizados e alocados em quatro grupos, com doze animais cada. Os animais de cada um dos quatro grupos foram subdivididos, nos tempos experimentais de 7 e 14 dias, contendo 6 animais em cada.

6.5 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os 48 animais foram randomizados nos grupos: Grupo Controle (C), Grupo Membrana Amniótica Humana (MAh), Grupo Laser de Baixa Intensidade (TLBI) e Grupo Laser de Baixa Intensidade com Membrana Amniótica Humana (MAh+TLBI). Cada grupo foi composto de 12 animais que, para efeitos de análise histológica, foram subdivididos em 2 tempos experimentais: 7 e 14 dias. Dessa forma, em cada grupo, 6 animais foram acompanhados até o primeiro tempo

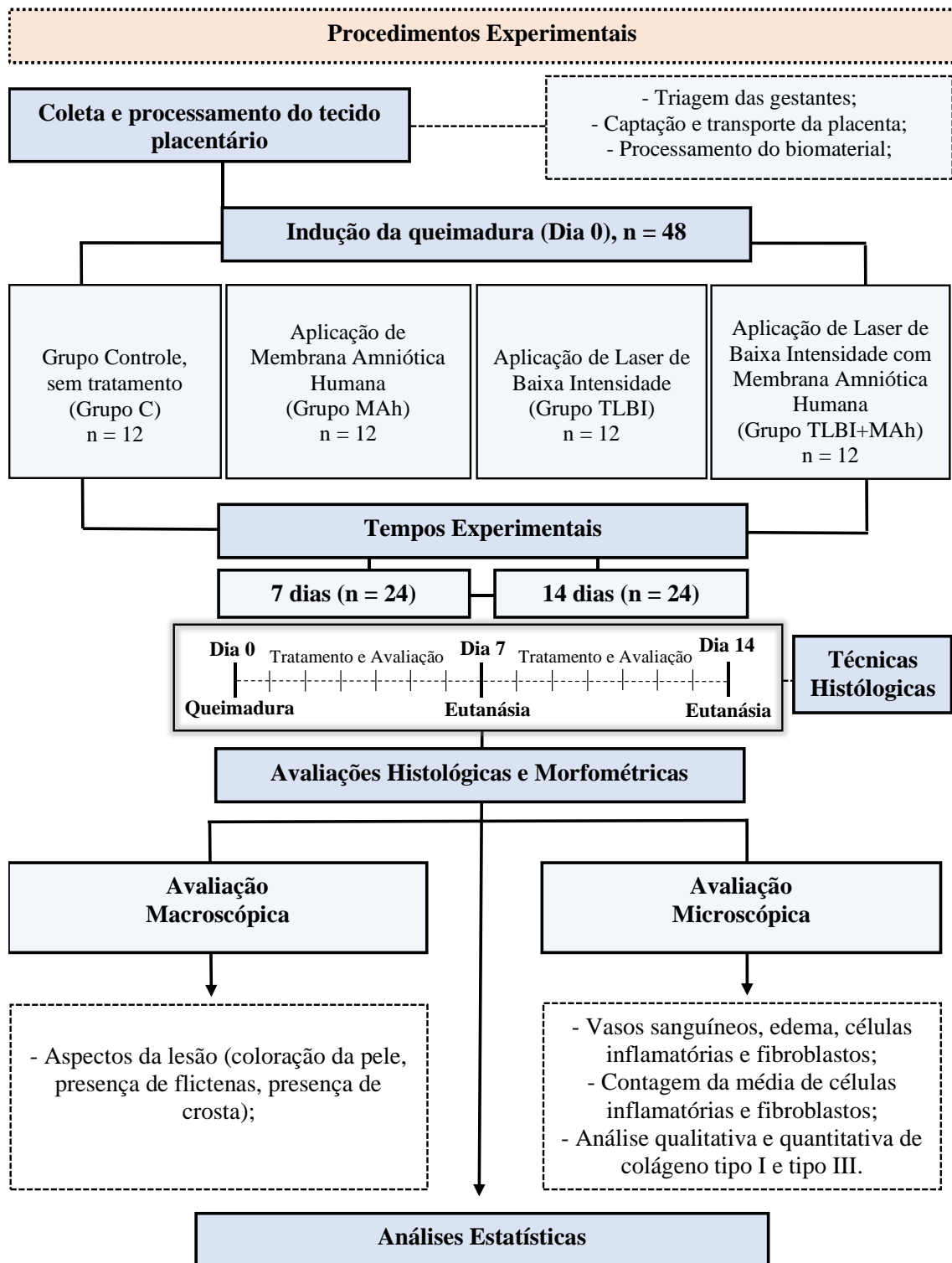
experimental e os outros 6 até o segundo tempo. Ao final de cada tempo experimental, todos os animais de cada subgrupo foram submetidos à eutanásia. Os procedimentos experimentais estão descritos a seguir:

- Grupo Controle (C) – os animais não receberam nenhum protocolo de tratamento após queimadura por contato. A ferida foi mantida sem coberturas durante o experimento.
- Grupo Membrana Amniótica Humana (MAh) – 30 minutos após queimadura por contato, foi realizada uma única aplicação do fragmento de MAh.
- Grupo Laser de Baixa Intensidade (TLBI) – 30 minutos após a queimadura por contato, iniciaram-se as irradiações com TLBI de forma pontual, repetidas a cada 24h.
- Grupo Laser de Baixa Intensidade associado à Membrana Amniótica Humana (TLBI+MAh) - 30 minutos após queimadura por contato, foi aplicado um fragmento de MAh. Após 30 minutos realizou-se a aplicação de TLBI de forma pontual, repetida a cada 24h

6.6 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Para os procedimentos experimentais foram delineadas as etapas: 1 – Coleta e processamento do tecido placentário; 2 – Indução da queimadura; 3 – Aplicação da MAh; 4 - Fotobiomodulação com TLBI; 5 – Técnicas Histológicas; 6 – Avaliações Histológicas e Morfométricas; 7 – Análises Estatísticas (Figura 3). Ressalta-se que em todos os procedimentos experimentais foram utilizados os equipamentos de proteção individual (EPI).

Figura 3 - Fluxograma das etapas dos procedimentos experimentais. Teresina, Piauí, Brasil, 2021.



Fonte: Elaborado pela autora

6.6.1 Indução da queimadura

A padronização das lesões por queimaduras depende da temperatura de contato ao longo

do tempo e da força do peso da superfície aquecida que permanece em contato com a superfície cutânea. O controle destes parâmetros é fundamental para obter queimaduras com padrões semelhantes, assim como é necessário manter e controlar a temperatura da superfície aquecida durante o período de tempo em contato com a pele. Assim a temperatura da superfície de contato em tempo real (T) e a força do peso (WF) são características fundamentais de um modelo de queima (ARDA *et al.*, 2018)

No presente estudo, a indução da queimadura ocorreu no laboratório de cirurgia experimental do Centro Universitário UNINOVAFAPI. Para a indução da queimadura superficial parcial os animais foram pesados e anestesiados com a combinação de Xilazina (2%, 0,01 ml/kg) e Ketamina (10%, 0,005 ml/kg) por via intramuscular. Em seguida, a região dorsal dos animais foi epilada manualmente. A queimadura experimental foi induzida por meio de uma proveta com 3 cm de diâmetro, preenchida com 50 mL de água aquecida à 100° C, colocada em contato direto com a pele da região epilada em ângulo de 90°, por 10 segundos, sem pressão adicional. Em sequência, as lesões foram avaliadas considerando os aspectos macroscópicos da pele vermelha ou rósea e a presença de flictenas e confirmadas pela avaliação histológica do patologista para caracterização da queimadura de espessura parcial superficial (ABAZARI *et al.*, 2020).

6.6.2 Coleta e processamento do tecido placentário

A captação da placenta obedeceu às normas estabelecidas pela Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA) considerando a classificação quanto ao médio/baixo risco potencial: triagem clínica e laboratorial do doador, coleta da placenta, armazenamento e transporte (BRASIL, 2017b).

As gestantes doadoras das placentas (duas) foram selecionadas na admissão por meio da aplicação de questionário e após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE), considerando os seguintes critérios de inclusão: programação de cesariana eletiva; história clínica saudável; exames sorológicos negativos para HIV-1, VDRL, HbsAg e anti-HCV; idade gestacional entre 37 e 41 semanas e 6 dias (placenta a termo), critérios estes estabelecidos em estudo de Sant'Anna *et al.*, (2011).

A placenta foi captada imediatamente após sua retirada e inspeção, pelo obstetra e pesquisadora, sendo imediatamente acondicionada em saco plástico estéril, dentro de caixa térmica com gelo reutilizável, para manutenção da temperatura em torno de 10 ° C, sem contato direto do material com o gelo para a prevenção de danos nas regiões da placenta. O

processamento do biomaterial foi realizado no laboratório de Histologia do Centro Universitário - UNINOVAFAPI, por meio de técnicas assépticas e considerando todos os protocolos que nortearam esta etapa (HENNERBICHLER *et al.*, 2007; CARGNONI *et al.*, 2009; SANT'ANNA *et al.*, 2016).

Resumidamente, o processamento foi realizado sob capela de fluxo laminar e ocorreu em duas etapas: na primeira etapa, realizou-se a inspeção da placenta e membranas fetais; na segunda etapa, a MAh foi separada manualmente do corion e lavada abundantemente com solução fisiológica (0,9%) contendo 100 U/mL de Penicilina, 100 mg/mL de Estreptomicina e Anfotericina B, até adquirir aspecto transparente. Descartaram-se as regiões com rupturas ou com coágulos fortemente aderidos. A MAh foi colocada em bandeja de plástico estéril transparente, sobre uma folha dimensionada em quadros de 4x4cm, para secção de fragmentos com dimensão adequada ao projeto. Esses fragmentos foram armazenados a temperatura ambiente em frascos de 50 mL contendo 40 mL de meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's (DMEM), sem soro vermelho de fenol em condições estéreis.

6.6.3 Aplicação da MAh

Após o processamento do biomaterial os fragmentos da MAh foram aplicados na área queimada dos animais em dois grupos experimentais, MAh e TLBI+MAh, com a face mesenquimal voltada para a área da lesão cutânea, ultrapassando em um 1 cm as bordas da lesão, e fixados com adesivo tópico. A aplicação da MAh ocorreu 30 minutos após a queimadura.

6.6.4 Fotobiomodulação com TLBI

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 estão descritos no quadro 1.

Quadro 1 - Parâmetros do TLBI utilizados para irradiação em modelo experimental de queimaduras de espessura parcial superficial em ratos Wistar (n=48). Teresina, Piauí, Brasil, 2021.

Parâmetros	Especificações
Modelo do aparelho	Laserpulse - Ibramed©
Comprimento de Onda (nm)	660 nm
Potência (mW)	30 mW
Tempo de Irradiação (s)	12 segundos por ponto
Área de contato (cm ²)	0,06310 cm ²
Densidade de Energia (J/cm ²)	6 J/cm ²
Parâmetros de Pulso	Contínuo
Número de Tratamentos	Dose Única
Intervalos de Tratamentos	24h
Localização Anatômica	Dorso

Fonte: Elaborado pela autora.

As irradiações ocorreram de forma pontual em quatro pontos equidistantes, em formato de cruz e à 1 cm da borda da lesão por queimadura. Durante o contato da ponteira laser com a pele lesada foi mantido ângulo de 90° e proteção da ponta do laser com filme transparente estéril, objetivando a prevenção de contaminação.

Quanto à densidade de energia, utilizou-se a dose de 6 J/cm², ideal para indução do processo de reparo tecidual, cujas recomendações para efeitos cicatrizantes é entre 3 e 6 J/cm² (FELICE *et al.*, 2009; LINS *et al.*, 2011; ANDRADE; CLARK FERREIRA, 2014). 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 (MEIRELLES *et al.*, 2008; NUÑEZ *et al.*, 2013; TRAJANO *et al.*, 2015)

6.6.5 Eutanásia dos Animais

Os animais de cada grupo foram eutanasiados aos 7 e 14 dias após a queimadura, com dose intraperitoneal excessiva (100 mg/kg) de Tiopental. Os fragmentos de interesse foram excisados para processamento histológico de rotina, e os animais foram descartados de acordo com as diretrizes estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA, 2013).

6.6.6 Técnicas Histológicas

A área da pele queimada e a área circundante, incluindo toda a área da lesão e as bordas

do tecido normal adjacente (1cm 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 3µm foram feitos de cada bloco, distendidos em lâminas de vidro e corados com Hematoxilina e Eosina (H&E) e *Picrosirius Red*.

6.6.7 Avaliações Histológicas e Morfométricas

A área lesionada foi avaliada macroscopicamente 0, 7 e 14 dias após a queimadura, utilizando as imagens capturadas com uma câmera digital (Nikon Coolpix P100, resolução de 12 megapixels), sem flash e com luz natural, fixada em um tripé, a uma distância de 20 cm da ferida. As imagens das lesões foram observadas macroscopicamente quanto à 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 e fibroblastos, 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 J Pro-plus. 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 (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2018; MONTES; JUNQUEIRA, 1991). Todas as análises histomorfométricas foram realizadas de forma cega.

6.6.8 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

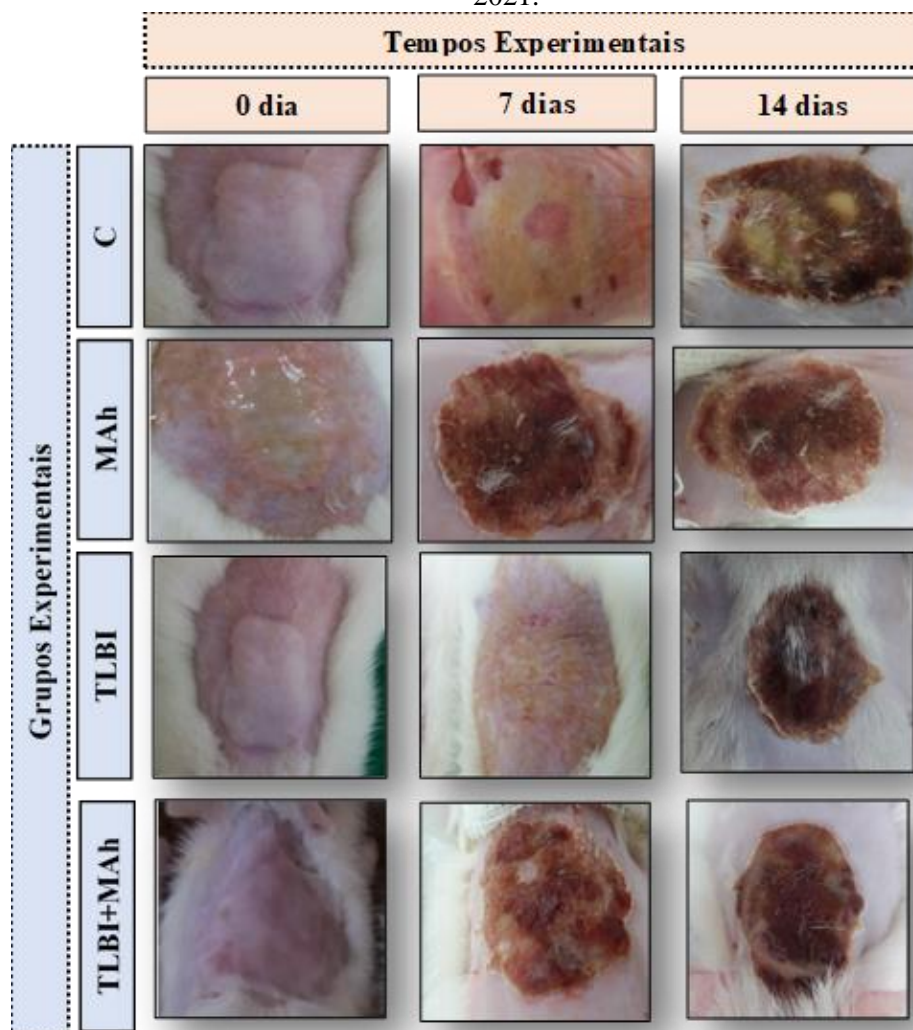
V (GraphPad Software, California, USA) e o teste de Kolmogorov-Smirnov, para a análise da distribuição dos dados. Devido a apresentação não paramétrica, foi aplicado o teste Mann Whitney na análise intragrupos. Para a comparação entre os grupos foi aplicado Kruskal-Wallis test com pós de Dunn's Multiple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

7 RESULTADOS

7.1 ANÁLISE MACROSCÓPICA

Os animais de todos os grupos apresentaram hiperemia e presença de flictenas no primeiro dia (dia 0). Nos grupos MAh e TLBI+MAh, observou-se acomodação da membrana amniótica na região da lesão por queimadura. Aos 7 dias, nos animais dos grupos C e TLBI foram observadas hiperemia e xerodermia na área central das lesões, enquanto nos grupos MAh e TLBI+MAh a membrana permaneceu aderida, com formação de crosta. Aos 14 dias, nos grupos C e TLBI, notou-se formação da crosta, enquanto nos grupos MAh e TLBI+MAh a não era mais possível identificar a MAh, devido à sua integração aos tecidos da lesão (Figura 4).

Figura 4 - Imagens macroscópica das lesões por queimadura de espessura superficial parcial em ratos Wistar nos grupos C, MAh, TLBI e TLBI+MAh, aos sete e quatorze dias (n = 48). Teresina, PI, Brasil, 2021.



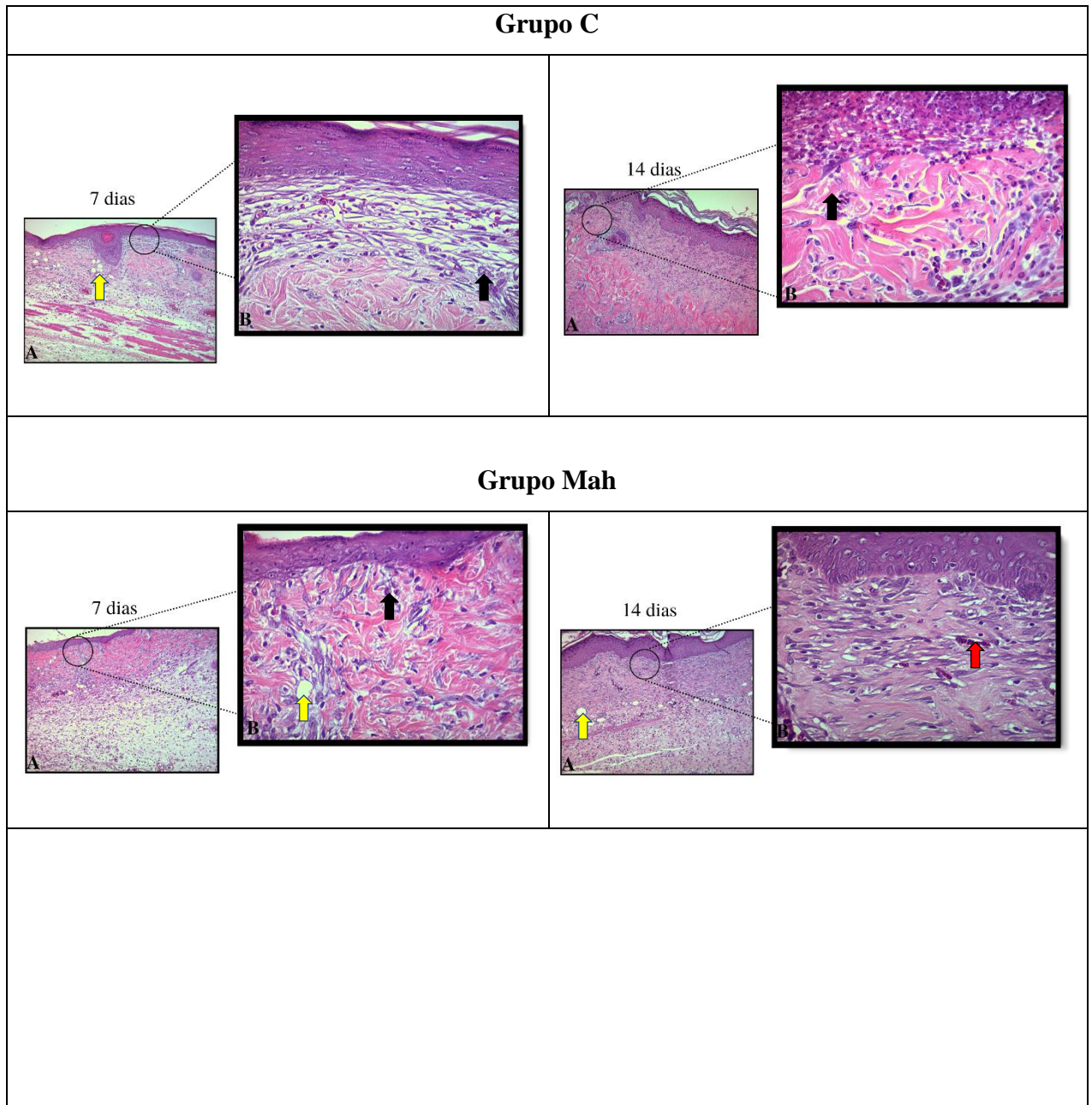
Fonte: Elaborado pela autora.

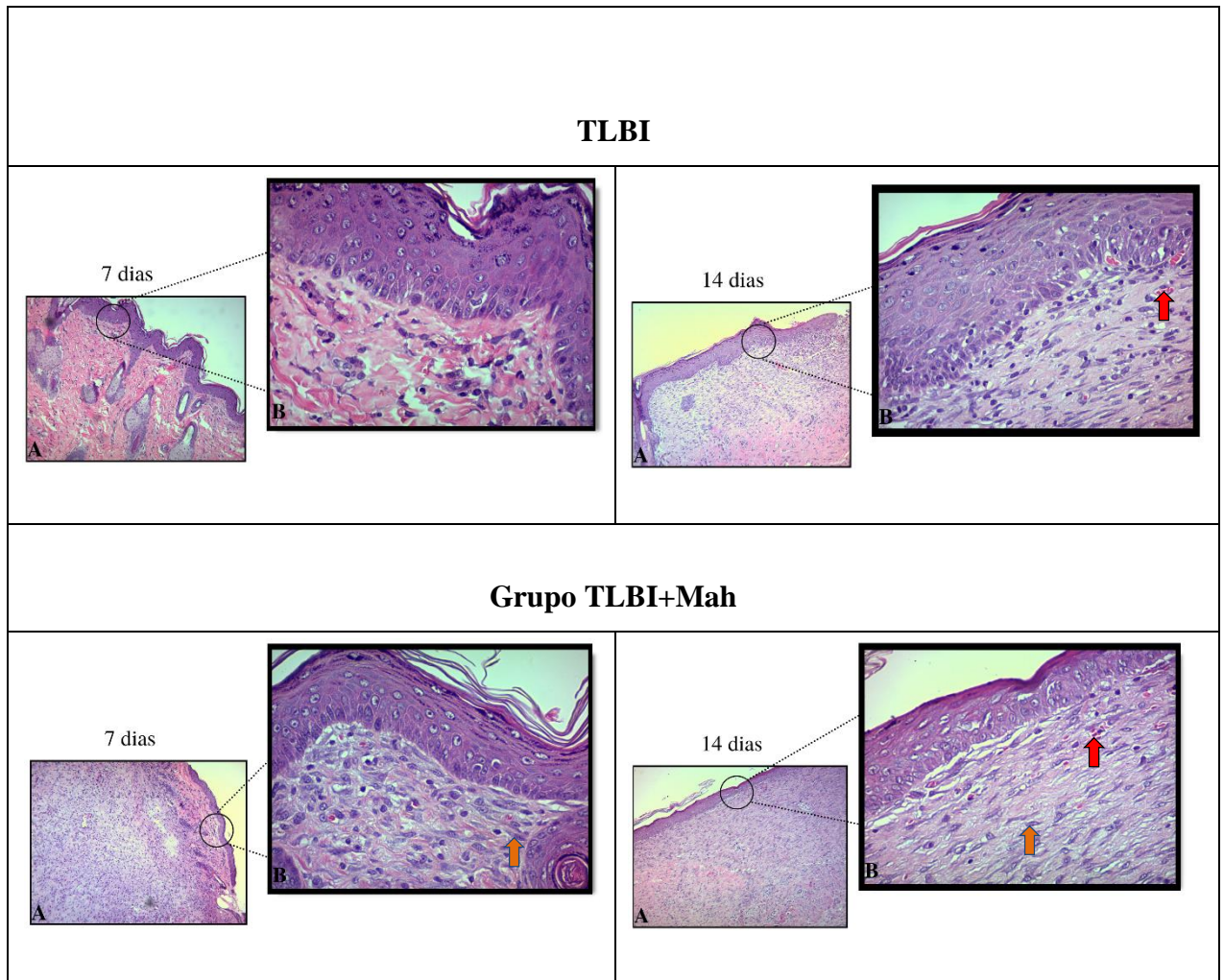
7.2 ANÁLISE MICROSCÓPICA

7.2.1 Células inflamatórias

A avaliação das fotomicrografias das lâminas histológicas coradas com H&E mostram a progressão da cicatrização das lesões após queimaduras superficial parcial em todos os grupos e tempos experimentais (Figura 5).

Figura 5 - Fotomicrografias mostrando alterações histopatológicas em queimaduras de espessura superficial parcial em ratos Wistar nos grupos C, MAh, TLBI e TLBI+MAh aos sete e quatorze dias (n = 48). Teresina, PI, Brasil, 2021.



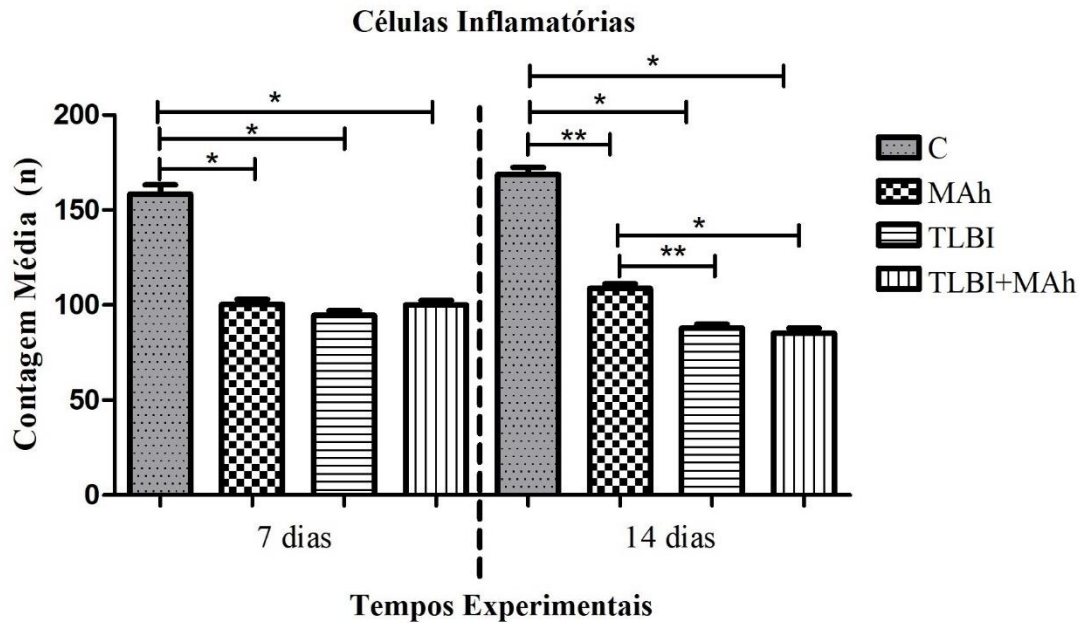


Legenda: As setas vermelhas representam os vasos sanguíneos, setas amarelas áreas de edema, setas pretas infiltrado inflamatório e setas laranjas fibroblastos. A - Aumento inferior (10X) B – Aumento superior (40X).

Fonte: elaborado pelo autor

Na análise intergrupos, aos 7 dias, os grupos MAh, TLBI e TLBI+MAh apresentaram diminuição extremamente significativa ($p < 0,0001$) do número de células inflamatórias em comparação com o Grupo C. No 14º dia, houve diferença estatística de todos os grupos com tratamento comparados ao controle, com maior significância estatística ($p < 0,0001$) apresentada com relação aos grupos TLBI e TLBI+MAh. No mesmo tempo experimental, o protocolo com a associação das terapias (TLBI+MAh) apresentou menor média de células inflamatórias em relação ao grupo MAh ($p < 0,0001$), sem significância estatística quando esse grupo foi comparado ao grupo TLBI. O grupo C apresentou a maior média de células inflamatórias em todos os períodos analisados (Figura 6).

Figura 6 - Representação gráfica do efeito da fotobiomodulação com TLBI e da membrana amniótica, aplicadas isoladamente ou em associação, na contagem média de células inflamatórias em queimaduras de espessura superficial parcial em ratos Wistar (n = 48). Teresina, PI, Brasil, 2021.



*Diferença extremamente significativa ($p < 0,0001$); **Diferença significativa ($p < 0,05$)

Fonte: elaborado pelo autor.

A análise intragrupo das células inflamatórias demonstrou que os grupos TLBI e TLBI+MAh evidenciaram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os tempos experimentais (Tabela 1).

Tabela 1: Análise histopatológica intragrupo da média da contagem de células inflamatórias (média \pm erro-padrão) dos grupos C, MAh, TLBI e TLBI+MAh aos 7 e 14 dias após queimaduras por contato de espessura superficial parcial em ratos Wistar (n = 48). Teresina, PI, Brasil, 2021.

Grupos	Células Inflamatórias			p
	Tempos experimentais		7 dias	
	7 dias	14 dias		
Controle	158,4 \pm 4,92	168,8 \pm 3,64	158,4 \pm 4,92	ns
MAh	100,5 \pm 2,53	108,8 \pm 2,40	100,5 \pm 2,53	ns
TLBI	94,6 \pm 2,43	87,5 \pm 2,12	94,6 \pm 2,43	< 0,0001
TLBI + MAh	99,42 \pm 2,451	85,24 \pm 2,64	99,42 \pm 2,451	< 0,0001

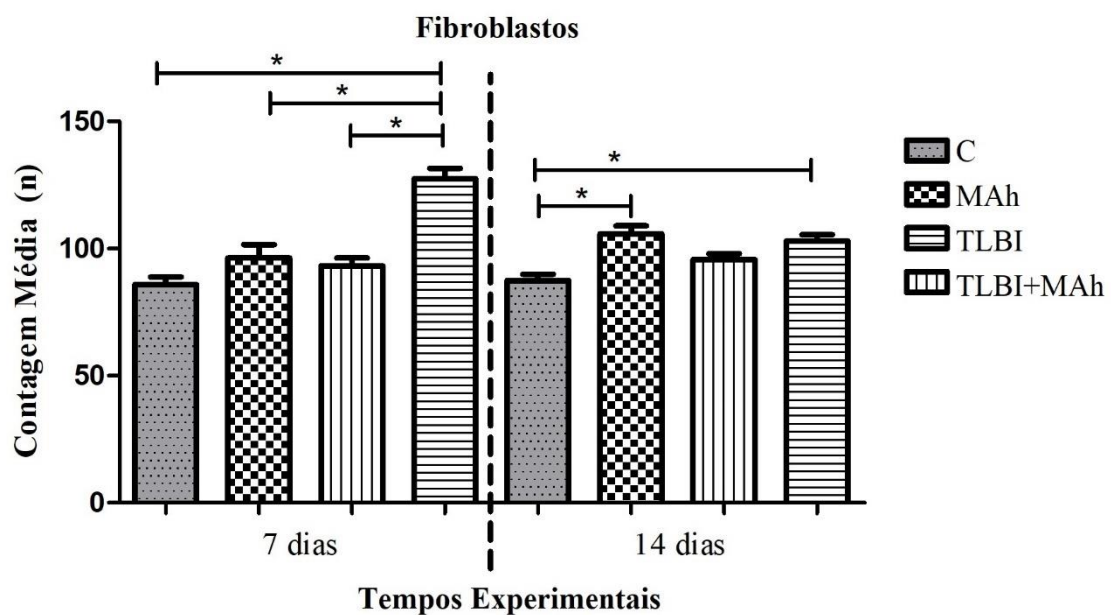
*ns = sem significância estatística

Fonte: elaborado pelo autor.

7.2.2 Fibroblastos

Na análise intergrupos, no 7º dia os grupos MAh, TLBI e TLBI+MAh houve aumento extremamente significativo ($p < 0,0001$) da média de fibroblastos em comparação com o Grupo C. No 14º dia, houve aumento extremamente significativo ($p < 0,0001$) dos fibroblastos dos grupos MAh e TLBI+MAh quando comparados ao grupo C (Figura 7).

Figura 7 - Representação gráfica do efeito da fotobiomodulação com TLBI e da membrana amniótica, aplicadas isoladamente ou em associação, na contagem média de fibroblastos em queimaduras de espessura superficial parcial em ratos Wistar ($n = 48$). Teresina, PI, Brasil, 2021.



Fonte: elaborado pelo autor

A análise intragrupo dos fibroblastos mostrou que os grupos MAh apresentaram aumento significativo dessas células ($p < 0,05$) e, com maior significância ($p < 0,0001$) na comparação com o grupo TLBI+MAh. Em relação ao grupo C não houve diferenças estatísticas nos tempos experimentais estudados (Tabela 2).

Tabela 2 - Análise histopatológica intragrupo da média da contagem de células inflamatórias (média \pm erro-padrão) após tratamento com MAh, TLBI e TLBI+MAh aos 7 e 14 dias após queimaduras por contato de espessura superficial parcial em ratos Wistar (n = 48). Teresina, PI, Brasil. 2021.

Grupos	Fibroblastos		
	Tempos experimentais		
	7 dias	14 dias	<i>p</i>
Controle	85,8 \pm 3,05	87,5 \pm 2,42	<i>ns</i>
Mah	96,2 \pm 6,23	105,8 \pm 5,31	<0,05
TLBI	102,9 \pm 2,56	97,04 \pm 2,82	<i>ns</i>
TLBI + Mah	134,4 \pm 3,30	93,21 \pm 3,04	<0,0001

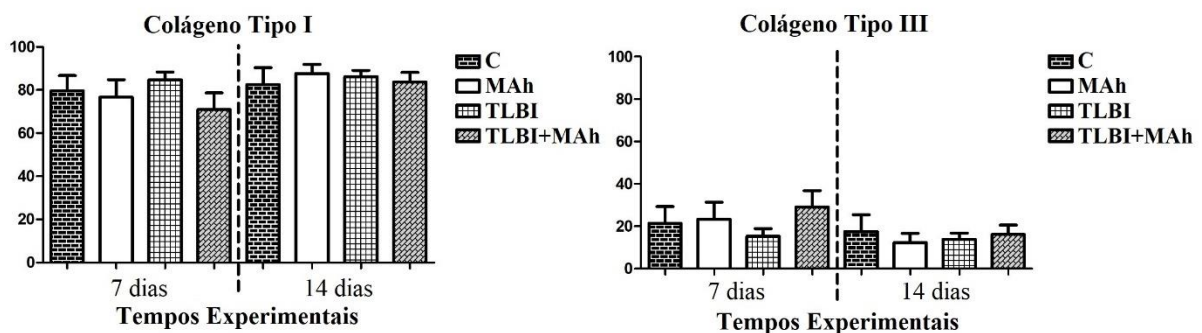
*ns = sem significância estatística

Fonte: elaborado pelo autor

7.2.3 Colágeno

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 8).

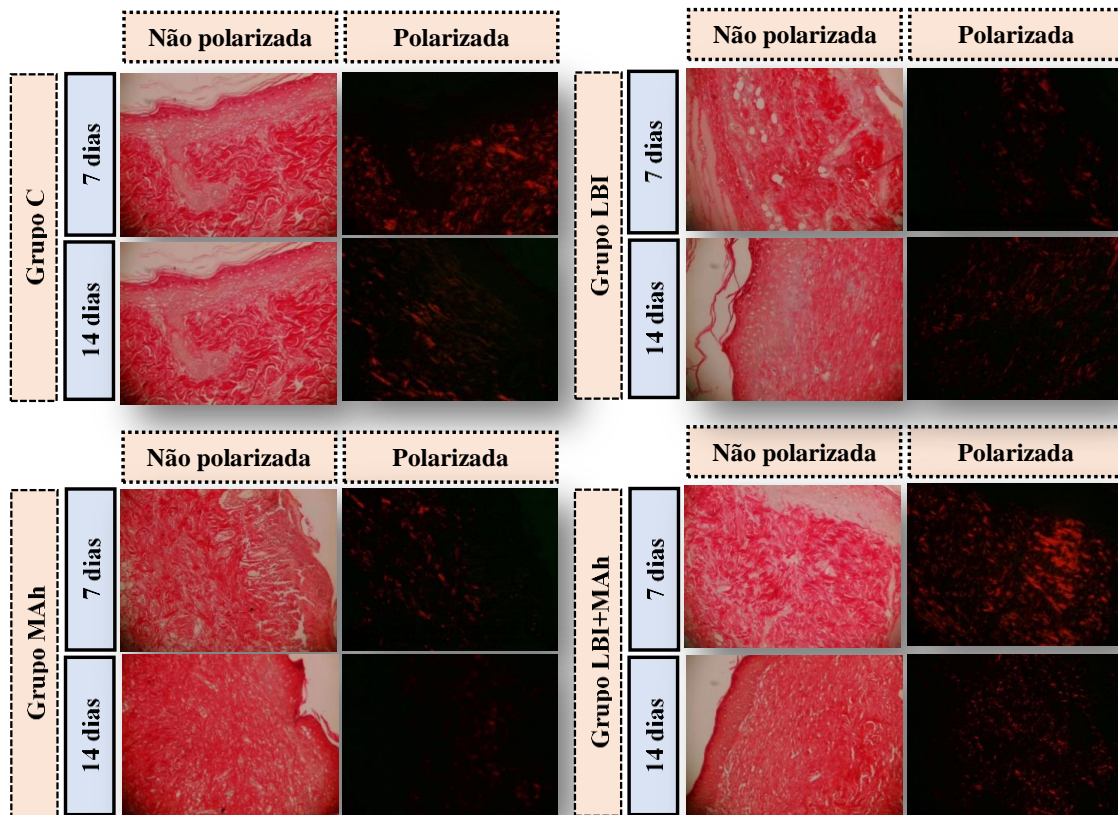
Figura 8 - Representação gráfica do efeito da fotobiomodulação com TLBI e da membrana amniótica, aplicadas isoladamente ou em associação, no percentual de colágeno dos tipos III e I em queimaduras de espessura superficial parcial em ratos Wistar (n = 48). Teresina, PI, Brasil, 2021.



Fonte: elaborado pelo autor

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 9).

Figura 9 - 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, 2021.



Fonte: elaborado pelo autor

8 DISCUSSÃO

Nosso estudo é pioneiro na associação da fotobiomodulação com TLBI à MAh para tratar lesões por queimadura parcial superficial 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.

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, necrose tecidual e pode atingir epiderme, derme e tecidos profundos. Destaca-se ainda a necessidade de internações e altos custos hospitalares (ZHANG *et al.*, 2010; FRANCK *et al.*, 2016).

A busca por tratamentos de baixo custo para queimaduras tem sido intensa, motivando pesquisas sobre novas alternativas, entre as quais a membrana amniótica e seus derivados (BARBUTO *et al.*, 2015). Assim, estudos *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado o grande potencial da MAh em medicina regenerativa como opção de tratamento para diferentes tipos de feridas (DE ALENCAR FONSECA SANTOS *et al.*, 2018; KSHERSAGAR *et al.*, 2018; LASHGARI *et al.*, 2019; RAHMAN *et al.*, 2019; RANA *et al.*, 2020).

O processo de reparação das lesões teciduais apresenta quatro fases sobrepostas: hemostasia, inflamação, proliferação e maturação. A fase inflamatória é caracterizada principalmente pela fagocitose de células e restos de tecidos por células de defesa, principalmente neutrófilos e macrófagos, preparando uma área para reparo tecidual. Nas demais fases, ocorre intensa proliferação celular, formação de matriz extracelular e fibras de colágeno (ABAZARI *et al.*, 2020).

Verificam-se vários estudos clínicos e experimentais usando TLBI na 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 (DAHMARDEHEI *et al.*, 2016; RANJBAR; TAKHTFOOLADI, 2016; RATHNAKAR *et al.*, 2016; VAGHARDOOST *et al.*, 2018; YADAV *et al.*, 2018; NILFOROUSHZADEH *et al.*, 2019).

A fotobiomodulação com TLBI tem sido usada com a finalidade de diminuir o processo inflamatório, reduzir a dor e o edema, além de preservar e restaurar tecidos danificados pela injúria. Estes efeitos podem ser alcançados com comprimentos de onda entre 600 e 1000 nm (HUANG *et al.*, 2011). Nesse sentido, estudos clínicos e experimentais com queimaduras de espessura parciais e totais têm utilizado a fotobiomodulação com comprimento de onda de 660

nm, ratificando a escolha desse parâmetro também em nosso estudo (WEBB *et al.*, 1998; MEIRELES *et al.*, 2008; NÚÑEZ *et al.*, 2013; TRAJANO *et al.*, 2015).

Ressalta-se que para o tratamento de queimaduras de espessura parcial superficial são considerados ideais os curativos com capacidade de preservar o calor, fornecer umidade, ser impermeável a micro-organismos, ser seguro e não aderir à lesão ou necessitar de trocas frequentes (MOREIRA *et al.*, 2020). Logo, a MAh destaca-se por ser um biomaterial que possui essas características, além de ter sido atestada em estudos clínicos como responsável pela redução da dor nos pacientes, pela ação protetora e pela redução do edema local (DUARTE; DUVAL-ARAUJO, 2014; MOHAMMADI *et al.*, 2017; LASHGARI *et al.*, 2019).

No presente estudo, não foram observados sinais flogísticos nas lesões em nenhum dos grupos e tempos experimentais avaliados. Infere-se que a aplicação dos fragmentos de MAh diminui o risco de infecção por cobrir a área lesada, atuando como barreira física e biológica contra invasão de microrganismos (BARADARAN-RAFII *et al.*, 2008).

A fase migratória da reparação tecidual é caracterizada pela formação de uma crosta a partir do coágulo que se forma na área da lesão, permitindo a migração de células epiteliais na região (SHAKESPEARE, 2001; GUO *et al.*, 2017). Nossos resultados mostraram, macroscopicamente, que os grupos que utilizaram MAh aceleraram a formação da crosta sugerindo que este biomaterial favoreceu a fase migratória.

Vale ressaltar que o âmnio é capaz de promover umidade na lesão, evitar irritação e ressecamento da ferida (ESKANDARLOU *et al.*, 2016). Nesse sentido, o fato de manter a superfície da ferida umedecida e oxigenada pode acelerar o processo de migração (RAVISHANKER; BATH; ROY, 2003; BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005). Ratificando essas evidências, nossos achados macroscópicos relacionados à xerodermia, observada no grupo TLBI, mostram que esta foi atenuada quando houve uso associado MAh, sinalizando que o biomaterial conferiu umidade ao microambiente.

Comprovamos também que a antecipação da formação completa da crosta das lesões tratadas com MAh, no 7º dia, teve relação direta com a histologia que evidenciou ativação de neutrófilos e macrófagos na inflamação aguda, prevenção do processo inflamatório exacerbado, neoformação vascular e proliferação de fibroblastos. Essas características confirmaram resultados de outros estudos que enfatizaram que a matriz recém-depositada confere à lesão um microambiente que favorece a restauração da integridade estrutural do tecido a partir da movimentação das células sobre a matriz extracelular, da liberação e ação de fatores de crescimento, sobre a proliferação celular e angiogênese (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005; PEACOCK; WINKLE, 1984; STEEN *et al.*, 2020).

Em um estudo com feridas agudas, a lesão induzida revelou que quando a inflamação é exacerbada e prolongada há prejuízos no processo de reepitelização, pois modifica diretamente a formação do tecido de granulação, com aumento na possibilidade de formação de cicatriz (QIAN *et al.*, 2016). Estudo realizado com camundongos mostrou que embora o estágio inflamatório seja vital para a reparação do tecido, a presença dessas células, como neutrófilos, pode atrasar o fechamento da ferida, tornando sua depleção essencial para acelerar o processo de cicatrização (DOVI; HE; DIPIETRO, 2003). Em queimaduras, a inflamação precoce de maneira controlada levou à cicatrização de feridas, mas a inflamação prolongada foi prejudicial (ZHANG *et al.*, 2010).

Nesta pesquisa verificou-se que nos períodos 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, o grupo TLBI+MAh foi mais efetivo que o uso isolado do TLBI e da MAh, evidenciando os efeitos aditivos de modulação da atividade inflamatória que o tratamento combinado pode promover.

De maneira similar, a modulação da resposta inflamatória foi evidenciada na cicatrização de enxertos de pele em ratos, em estudo recente, que utilizou o mesmo protocolo de TLBI aplicado em nosso estudo (MOREIRA *et al.*, 2020). Além disso, corroborando com nossos achados, os efeitos com uso de dose única de TLBI têm sido apontados na literatura, entre eles, a aceleração da fase inflamatória em reparo de pele (NÚÑEZ *et al.*, 2013).

Sabe-se que a inflamação e a angiogênese são fatores importantes na determinação da cura de feridas e que a diminuição do processo inflamatório viabiliza o aumento da angiogênese. Assim, as propriedades de modulação dos níveis de inflamação e proliferação celular são apresentadas em pesquisas com TLBI (GUPTA *et al.*, 2015; RATHNAKAR *et al.*, 2016). No contexto da associação da TLBI com outras terapias no tratamento de queimaduras, estudo que usou laserterapia combinada com mel medicinal obteve resultados de atenuação da inflamação e da dor, aumento da proliferação celular e aceleração do processo de reparo (YADAV *et al.*, 2018).

Uma resposta biológica de cura com ação no estímulo da proliferação de fibroblastos e melhoria da microcirculação também tem sido comprovada no contexto da fotobiomodulação com TLBI (IHSAN, 2005; HASHMI *et al.*, 2010; RANJBAR; TAKHTFOOLADI, 2016). Da mesma forma, a MAh tem sido aplicada em feridas agudas e crônicas, e estudos evidenciam resultados promissores com o uso desse biomaterial na cicatrização dessas lesões devido a suas propriedades (NICODEMO *et al.*, 2017; CAMPELO *et al.*, 2018; HAN *et al.*, 2019). Destaca-se que os curativos utilizados com este biomaterial ou em associação deste com outros produtos

podem facilitar a proliferação dos fibroblastos, conseqüentemente, contribuindo com a liberação de fatores angiogênicos e aceleração do processo de reparo (RAVISHANKER; BATH; ROY, 2003; TORTORA; DERRICKSON, 2016; SANT'ANNA *et al.*, 2016; KSHERSAGAR, 2018; RAHMAN *et al.*, 2019; ZHANG *et al.*, 2020).

Nossos achados mostram 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 aparecimento precoce da fase proliferativa. Essa etapa se caracterizou pelo aumento extremamente significativo de fibroblastos no grupo TLBI+MAh, em relação a todos os outros grupos experimentais, evidenciando a alta capacidade de reparação do tecido queimado quando o tratamento empregou as terapias associadas.

A fase proliferativa da reparação tecidual é caracterizada pela multiplicação de células epiteliais sob a superfície da crosta, fibroblastos produtores de matriz extracelular e fibras de colágeno, além de intensa neoformação vascular (SHAKESPEARE, 2001).

Observamos, em nosso estudo, que inicialmente houve aumento extremamente significativo da média de fibroblastos em todos os grupos que receberam intervenção em relação ao grupo controle. Destaca-se que as terapias mais efetivas na redução da inflamação aconteceram nos grupos TLBI e TLBI+MAh. Em contrapartida, o estímulo à proliferação de fibroblastos foi significativamente maior nos grupos de MAh e TLBI+MAh.

A MAh apresenta diversos fatores que atuam ativamente na proliferação celular, como o fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento epidérmico (EGF) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Fatores bioativos, o fator de crescimento transformante β (TGF β), fatores anti-inflamatórios e a presença de colágeno dos tipos II, III, IV, V, VI e VIII também foram identificados (LASHGARI *et al.*, 2019). Estudo *in vitro* confirmou a influência da células membrana amniótica na proliferação e no ciclo celular de fibroblastos e queratinócitos (KITALA *et al.*, 2019).

O fator básico de crescimento de fibroblastos (bFGF) tem sido apontado como fundamental na reparação tecidual de queimaduras em ratos, por seus efeitos sobre a proliferação, diferenciação e migração de queratinócitos, recrutamento de células inflamatórias, bem como para a neovascularização observada no tecido de granulação durante a fase inicial do processo de cicatrização de feridas (KIBE; TAKENAKA; KISHIMOTO, 2000).

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 destas em associação com outros produtos (YADAV, 2018; RAHMAN *et al.*, 2019, KSHERSAGAR

et al., 2018). No entanto, demonstramos, de forma inédita, 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 a introdução consistente dessa terapia combinada em protocolos clínicos de tratamento de queimaduras de espessura parcial superficial.

9 CONCLUSÃO

Em conclusão, atestou-se que o uso isolado ou associado da TLBI e MAh em lesões por queimaduras de espessura parcial superficial em ratos apresentam-se como terapias eficazes para regeneração da pele. As características macroscópicas, como aparecimento precoce da crosta, nas lesões tratadas com TLBI+MAh fortalecem os achados microscópicos que sugerem o início mais rápido do processo de reparo tecidual.

A fotobiomodulação com TLBI de 660 nm atuou sinergicamente à aplicação da MAh potencializando os efeitos anti-inflamatórios e estimulando a proliferação celular de fibroblastos, comprovando os efeitos benéficos da associação dessas terapias. Dessa forma, a hipótese alternativa deste estudo foi confirmada.

Embora este estudo tenha constatado melhora significativa na cicatrização de queimadura em ratos tratados com TLBI+MAh, existem algumas limitações que estão associadas ao fato do modelo animal utilizado apresentar conhecidamente notável potencial de regeneração de pele. No entanto, estas limitações não constituíram impedimento para validar os resultados e as conclusões realizadas a partir da análise deste estudo.

Para estudos futuros, seria importante identificar e quantificar os principais fatores cuja liberação é induzida pela MAh/ TLBI, responsáveis pela aceleração do processo de cicatrização de feridas. Além disso, recomenda-se a inclusão de tempos experimentais mais longos e outros testes que avaliem toda a evolução do processo de reparo tecidual nesse tipo de queimaduras. Assim, considerando as propriedades efetivas dos tratamentos investigados e a complexidade do processo de cicatrização em queimaduras, recomenda-se a ampliação dessas pesquisas visando sua introdução na prática clínica como mais uma opção de protocolo clínico de tratamento de queimaduras.

REFERÊNCIAS

- ABAZARI, M. *et al.* A Systematic Review on Classification, Identification, and Healing Process of Burn Wound Healing. **Int. J. Low Extrem Wounds**, 2020-06-11, p.153473462092485. Disponível em: <<https://doi.org/10.1177/1534734620924857>>. Acesso em: 02 jan. 2021.
- ADVANCED TRAUMA LIFE SUPPORT (student course manual). 10^a ed. Chicago: American College of Surgeons and National Association of Emergency Medical Technicians, 2018.
- ANDRADE, A. G.; LIMA, C. F.; ALBUQUERQUE, A. K. B. Efeitos do laser terapêutico no processo de cicatrização das queimaduras: uma revisão bibliográfica. **Rev Bras Queimaduras**, v. 9, n, 1, p. 21-30, 2010.
- ANDRADE, F. S. S. D.; CLARK, R. M. O.; FERREIRA, M. L. Efeitos da laserterapia de baixa potência na cicatrização de feridas cutâneas. **Rev. Col. Bras. Cir.**, Rio de Janeiro, v. 41, n. 2, p. 129-133, 2014.
- ARDA, M. S. *et al.* Comparison of Burn Depth at Different Temperatures on Ex Vivo Human Skin with Standardized Model and Comparison of the Results with Rat Contact Burn Model. **J Pediatr Res**, v. 5, n. 2, p. 88-91, 2018.
- BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas [online]**, v. 41, n. 1, p. 27-51, 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S1516-93322005000100004>>. Acesso em: 10 fev. 2021.
- BALES, J. G.; ROY, A. M. D; MEALS, M. D. Low-level Laser Treatment. **Evidence-Based Medicine**, JHS., v. 35, mar. 2010.
- BARADARAN-RAFII, A. *et al.* Amniotic Membrane Transplantation. **Journal of Ophthalmic & Vision Research** v. 2, 2008.
- BARBUTO, R. C. *et al.* Use of the amniotic membrane to cover the peritoneal cavity in the reconstruction of the abdominal wall with polypropylene mesh in rats. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgias [online]**. v. 42, n. 1, pp. 49-55, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/0100-69912015001010>>. Acesso em: 02 jan. 2021.
- BOLGIANI, A.N.; SERRA, M. C. V. F. Atualização no tratamento local das queimaduras. **Rev Bras Queimaduras**, v. 9, n. 2, pp. 38-44, 2010.
- BOURNE, G. The foetal membranes. A review of the anatomy of normal amnion and chorion and some aspects of their function. **Postgrad Med J**. v. 38, n. 438, pp. 193-201, 1962. Disponível em: <<https://doi.org/10.1136/pgmj.38.438.193>>. Acesso em: 22 jan. 2021.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de Inspeção em Bancos de Células e Tecidos: Boas Práticas em Células e Tecidos**. Brasília: Anvisa, 2017.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de Inspeção em Bancos de Células e Tecidos: Boas Práticas em Células e Tecidos**. Brasília: Anvisa, 2017.

BRASIL. Conselho Nacional de Saúde. **Resolução nº 466, de 12 de dezembro de 2012. Aprova normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos**. Brasília: Diário Oficial da União, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Diretrizes Operacionais para Comitês de Ética que avaliam pesquisas biomédicas**. Ministério da Saúde, Organização Mundial da Saúde. Brasília: Ministério da Saúde, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Queimados**. Brasília, 04 jul. 2017. Disponível em: <http://portalms.saude.gov.br/component/content/article/842-queimados/40990-queimados>. Acesso em: 15 maio 2019.

BRASIL. Norma Operacional nº 001, de 12 de setembro de 2013. Dispõe sobre a organização e funcionamento do Sistema CEP/CONEP, e sobre os procedimentos para submissão, avaliação e acompanhamento da pesquisa e de desenvolvimento envolvendo seres humanos no Brasil. **Diário Oficial da União**: Brasília, DF; set 2013.

BRASIL. Resolução nº 466, de 12 de dezembro de 2012. Dispõe sobre diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos. **Diário Oficial da União**: Brasília, DF, 13 jun. 2013.

BRASIL. Resolução nº 510, de 07 de abril de 2016. Dispõe sobre as normas regulamentadoras de pesquisas em Ciências Humanas e Sociais. **Diário Oficial da União**: Brasília, DF, 24 maio 2016.

BUSNARDO, V. L.; BIONDO-SIMÕES, M.L.P. Os efeitos do laser hélio-neônio de baixa intensidade na cicatrização de lesões cutâneas induzidas em ratos. **Rev. Bras. Fisioter**. São Carlos, v. 14, n. 1, p. 45-51, jan./fev. 2010.

CAMPELO, M. B. D. et al. Effects of the application of the amniotic membrane in the healing process of skin wounds in rats. **Acta Cirurgica Brasileira [online]**., v. 33, n. 02, pp. 144-155, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/s0102-865020180020000006>>. Acesso em: 02 jan. 2021.

CAMPOS, A. C. L.; BORGES-BRANCO, A.; GROTH, A. K. Cicatrização de feridas. **ABCD, arq. bras. cir. dig.**, São Paulo, v. 20, n. 1, p. 51-58, Mar. 2007.

CARDOSO, L.; ORGAES, F. S.; GONELLA, H. A. Estudo epidemiológico das queimaduras químicas dos últimos 10 anos do CTQ – Sorocaba/ SP. **Rev Bras Queimaduras**. v. 11, n. 2, pp. 74-9, 2012.

CARGNONI, A. *et al.* Amniotic membrane patching promotes ischemic rat heart repair. **Cell Transplant**. v. 18, n. 10, pp. 1147-59, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.3727/096368909X12483162196764>>. Acesso em: 02 fev. 2021

CARTAXO, C. K. A. Tratamentos e cuidados específicos com as vítimas de queimaduras. *In*: GEOVANINI, T. **Tratado de Feridas e Curativos: Enfoque Multiprofissional**. 1ª Ed. São

Paulo: Rideel, 2014.

CARVALHO, P. T. C. *et al.* Análise de fibras colágenas através da morfometria computadorizada em feridas cutâneas de ratos submetidos à irradiação do laser HeNe. **Fisioterapia Brasil**, v. 4, n. 4, p. 253-8, 2003.

CHUNG, J- H *et al.* Early Treatment Effects of Nonablative Fractional Lasers (NAFL) on Hypertrophic Scars in an Animal Model. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 53, n. 4, p. 537-548, 2021.

CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL - CONCEA (Porto Alegre). Resolução normativa nº 13, de 20 de setembro de 2013. Baixa as Diretrizes da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – Concea. **Ministério da ciência, tecnologia e inovação**: Seção 1, Porto Alegre, RS, p. 5, 20 set. 2013. Disponível em: http://www.mct.gov.br/upd_blob/0228/228451.pdf. Acesso em: 20 mar. 2019.

COUTINHO, B. G. Abordagem psicológica ao paciente queimado. *In*: MALAGUTTI, W.; KAKIHARA, C. T. (Orgs), **Curativos, Estomias e Dermatologia: uma abordagem multiprofissional**. 3ª ed. SP: Editora Martinari, p. 373-381, 2014.

DAHMARDEHEI, M. *et al.* Effects of low level laser therapy on the prognosis of split-thickness skin graft in type 3 burn of diabetic patients: a case series. **Lasers Med Sci**. v. 31, n. 3, p. 497-5002, 2016. <<https://doi.org/10.1007/s10103-016-1896-9>>. Acesso em: 02 jan. 2021

DE ALENCAR FONSECA SANTOS, Joelita *et al.* Effects of low-power light therapy on the tissue repair process of chronic wounds in diabetic feet. **Photomedicine and laser surgery**, v. 36, n. 6, p. 298-304, 2018.

DE ANDRADE, A. L. M. *et al.* Effect of photobiomodulation associated with cell therapy in the process of cutaneous regeneration in third degree burns in rats. **Journal of tissue engineering and regenerative medicine**, v. 14, n. 5, p. 673-683, 2020.

DINNI, V.; ROMANELLI, M. Avaliação Clínica e Instrumental das Feridas. *In*: MALAGUTTI, W.; KAKIHARA, C. T. (Orgs), **Curativos, Estomias e Dermatologia: uma abordagem multiprofissional**. 3ª ed. São Paulo: Martinari, 2014.

DOVI, J. V.; HE, L. K.; DIPIETRO, L. A. Accelerated wound closure in neutrophil-depleted mice. **J. Leukoc. Biol.**, v. 73, n. 4, p. 448-55, 2003. Disponível em: <<https://doi.org/10.1189/jlb.0802406>>. Acesso em: 26 mar. 2021.

DUARTE, I. G., L.; DUVAL-ARAUJO, I. Amniotic membrane as a biological dressing in infected wound healing in rabbits. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 29, n. 05, p. 334-339, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0102-86502014000500008>>. Acesso em: 02 jan. 2021.

ESKANDARLOU, M. *et al.* The Healing Effect of Amniotic Membrane in Burn Patients. **World J. Plast. Surg.**, v. 5, n. 1, p. 39-44, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4904137/pdf/wjps-5-039.pdf>>. Acesso em: 10 fev. 2021.

FELICE, T. D. *et al.* Utilização do laser de baixa potência na cicatrização de feridas. **Rev. Interbio**, v. 3, n. 2, p. 42-51, 2009.

FERNG, A. S. *et al.* Human Amniotic Membrane Promotes Antimicrobial Microenvironment in a Device-Related Infection. **J. Biomedical Science and Engineering**, v. 9, p.122-126, 2016.

FERRAZ, A.P.C.M; BELHOT, R.V. Taxonomia de Bloom: revisão teórica e apresentação das adequações do instrumento para definição de objetivos instrucionais. **Gestão & Produção.**, v. 17, n. 2, pp. 421-31, 2010.

FERREIRA, F. V.; PAULA, L. B. Sulfadiazina de prata versus medicamentos fitoterápicos: estudo comparativo dos efeitos no tratamento de queimaduras. **Rev Bras Queimaduras**, v. 12, n. 3, pp. 132-9, 2013.

FRANCK, C. L. *et al.* Padronização de queimaduras térmicas em ratos por contato direto com a superfície cutânea. **Rev Bras Queimaduras**, v. 17, n. 1, p. 14-19, 2018.

FRANCO, D.; GONCALVES, L. F. Feridas cutâneas: a escolha do curativo adequado. **Rev. Col. Bras. Cir.**, v.35, n.3, pp. 203-206, Mai/Jun, 2008.

FRYKBERG, R. G; BANKS, J. **Wound Healing Society**: Advances in wound care, v. 4, n. 9, p. 560-575, 2015.

GAGNON, D. *et al.* an in vitro method to test the safety and efficacy of low-level laser therapy (lllt) in the healing of a canine skin model. **bmc veterinary research**, v. 12, n. 1, p. 1-10, 2016.

GAGNON, D. *et al.* An in vitro method to test the safety and efficacy of low-level laser therapy (LLLT) in the healing of a canine skin model. **BMC Vet. Res.**, v 12, p. 73, 2016.

GENUINO, G. A. *et al.* Topical petrolatum gel alone versus topical silver sulfadiazine with standard gauze dressings for the treatment of superficial partial thickness burns in adults: a randomized controlled trial. **Burns**, v. 40, n. 7, p. 1267-73, 2014.

GIBBONS, G. W. Grafix ®, a cryopreserved placental membrane, for the treatment of chronic/ stalled wounds. **Wound Healing Society**: Advances in wound care, v. 4, n. 9, p. 534-543, 2015.

GIL, A.C. **Como Elaborar Projetos de Pesquisa**. 6ª. São Paulo: Atlas, 2017.

GUIMARÃES, M. C. **Feridas e curativos**: uma forma simples e prática de tratar. Rio de Janeiro: Editora Rubio, 2011.

GUO, H. F. *et al.* A new model for studying deep partial-thickness burns in rats. **Int J Burns Trauma.**, v. 7, n. 6, p. 107-114, 2017. Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5665842/>>. Acesso em: 06 jan. 2021

GUPTA, A. et al. Superpulsed (Ga-As, 904 nm) low-level laser therapy (LLLT) attenuates inflammatory response and enhances healing of burn wounds. **J Biophotonics**. v. 8, n. 6, p. 489-501, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/jbio.201400058>>. Acesso em: 25 fev. 2021.

GURTNER, G. C.; CHAPMAN, M. A. Regenerative Medicine: Charting a New Course in Wound Healing. **Adv Wound Care (New Rochelle)**, v. 5, n. 7, p. 314-328, 2016.

HAN, L. G. *et al.* Differential response of immortalized human amnion mesenchymal and epithelial cells against oxidative stress. **Free Radic Biol Med.**, v. 135, p. 79-86, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.02.017>>. Acesso em: 22 jan. 2021.

HAN, S. W.; SOUZA, C. F.; CARVALHO, A. C. **Células-tronco: nova perspectiva terapêutica em Cardiologia**. São Paulo: Editora Atheneu, 2011.

HASHMI, J. T. Role of low-level laser therapy in neurorehabilitation. **PM R**. v. 2, Suppl.2, p. S292-305, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.pmrj.2010.10.013>>. Acesso em: 02 jan. 2021.

HECKMANN, N.; AURAN, R; MIRZAYAN, R. Application of Amniotic Tissue in Orthopedic Surgery. **Am J Orthop (Belle Mead NJ)**, v. 45, n. 7, p. E421-E425, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28005118>. Acesso em: 10 mar. 2019.

HENNERBICHLER, S. *et al.* The influence of various storage conditions on cell viability in amniotic membrane. **Cell Tissue Bank.**, v. 8, n. 1, p. 1-8, 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10561-006-9002-3>>. Acesso em: 02 fev. 2021.

HERNÁNDEZ, M. P. L.; CANO; R. M. H.; SORIA, M. I. S. Feridas crônicas atendidos em um departamento de emergência. **Rev. Enfermagem mundial**, v. 13, n. 3, p. 23-40, 2014.

HUANG, Y. Y et al. Biphasic dose response in low level light therapy - an update. 2011 **Dose Response.**, v. 9, n. 4, p. 602-18, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.2203/dose-response.11-009.Hamblin>>. Acesso em: 02 jan. 2021.

IHSAN, F. R. Low-level laser therapy accelerates collateral circulation and enhances microcirculation. **Photomed Laser Surg.**, v. 23, n. 3, p. 289-94, 2005 Disponível em: <<https://doi.org/10.1089/pho.2005.23.289>>. Acesso em: 02 jan. 2021.

ILIC, D. *et al.* Human amniotic membrane grafts in therapy of chronic non-healing wounds. **Br Med Bull**, v. 117, n. 1, p. 59-67, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26764358>. Acesso em: 12 fev. 2019.

IRION, G. L. **Feridas- Novas Abordagens, Manejo clinico e Atlas em cores**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015.

JUNQUEIRA, L.; CARNEIRO, J. **Histologia básica: texto e atlas**. 13^oed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018.

KIBE, Y.; TAKENAKA, H.; KISHIMOTO, S. Spatial and temporal expression of basic fibroblast growth factor protein during wound healing of rat skin. **Br J Dermatol.** v. 143, n. 4, p. 720-7, 2000. Disponível em: <<https://doi.org/10.1046/j.1365-2133.2000.03824.x>>. Acesso em: 27 jan. 2021.

KIFER, Z. A. **Tratamento de feridas: noções práticas para enfermeiro.** São Paulo: Andrei, 2013.

KITALA, D. et al. Amniotic cells share clusters of differentiation of fibroblasts and keratinocytes, influencing their ability to proliferate and aid in wound healing while impairing their angiogenesis capability. **Eur J Pharmacol.**, v. 854, p. 167-178, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.02.043>>. Acesso em: 27 jan. 2021.

KSHERSAGAR, J. et al. Decellularized amnion scaffold with activated PRP: a new paradigm dressing material for burn wound healing. **Cell Tissue Bank**, v. 19, n. 3, p. 423-436. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10561-018-9688-z>>. Acesso em: 02 jan. 2021.

LAKATOS, E. M.; MARCONI, M. A. **Fundamentos de metodologia científica.** 8º Ed. São Paulo; Atlas, 2019.

LIMA, D. F. *et al.* Perfil dos pacientes internados em uma unidade de tratamento de queimaduras. **Revista de Enfermagem UFPE online**, v. 10, n. 3, p. 1423- 1431, 2016.

LINS, R. D. A. U. *et al.* Aplicação do laser de baixa potência na cicatrização de feridas. **Odontol. Clín. Cient**, Recife, p. 511-516, out/dez, 2011.

MARTINS, F. *et al.* Low-level laser therapy modulates musculoskeletal loss in a skin burn model in rats. **Acta Cir. Bras**, São Paulo, v. 30, n. 2, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-86502015002000002>>. Acesso em: 20 fev. 2019.

MEIRELLES, G. C. S. et al. Effectiveness of laser photobiomodulation at 660 or 780 nanometers on the repair of third-degree burns in diabetic rats. *Photomedicine and Laser Surgery*, v. 26, n. 1, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1089/pho.2007.2051>>. Acesso em: 26 dez. 2019.

MOHAMAD, L.; MOHAMAD, R.; OMID, E. Assessment of outcome of using amniotic membrane enriched with stem cells in scar formation and wound healing in patients with burn wounds. **Bali Medical Journal.**, v. 8, n. 1, p. 41-46, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.15562/bmj.v8i1.1223>>. Acesso em: 02 jan. 2021.

MOHAMMADI, A. A. *et al.* Using Amniotic Membrane as a Novel Method to Reduce Post-burn Hypertrophic Scar Formation: A Prospective Follow-up Study. **J Cutan Aesthet Surg.**, v. 10, n. 1, p. 13-17, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.4103/JCAS.JCAS_109_16>. Acesso em: 02 jan. 2021.

MONTES, G. S.; JUNQUEIRA, L.C.U. The use of the picosirius-polarization method for the study of biopathology of collagen. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.86, n.03, p. 1-11, 1991.

- MOREIRA, S. H. *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.**, v. 35, n. 5, p. 1103-1109, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10103-019-02917-y>>. Acesso em: 02 jan. 2021.
- MOSCA, R. C. *et al.* Photobiomodulation therapy for wound care: a potent, noninvasive, photochemical approach. **Advances in skin & wound care**, v. 32, n. 4, p. 157-167, 2019.
- NICODEMO, M. C. *et al.* Amniotic membrane as an option for treatment of acute Achilles tendon injury in rats. **Acta Cirurgica Brasileira [online]**, v. 32, n. 2, p. 125-139, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/s0102-865020170205>>. Acesso em: 02 jan. 2021.
- NIKNEJAD, H. Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering. **Eur Cell Mater.** v. 15, p. 88-99, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.22203/ecm.v015a07>>. Acesso em: 03 mar. 2021.
- NILFOROUSHZADEH, M. A. *et al.* n 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.**, v. 10, Suppl 1, p. S7-S12, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.15171/jlms.2019.S2>>. Acesso em: 02 jan. 2021.
- NÚÑEZ, S. C. *et al.* The influence of red laser irradiation timeline on burn healing in rats. **Lasers Med Sci.**, v. 28, n. 2, p. 633-641, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10103-012-1105-4>>. Acesso em: 02 jan. 2021.
- PIVA, J. A.A.C. *et al.* Ação da terapia com laser de baixa potência nas fases iniciais do reparo tecidual: princípios básicos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 5, p. 947-954, 2011.
- POLIT, D. F; BECK, C. T. **Fundamentos de pesquisa em enfermagem: avaliação de evidências para a prática da enfermagem.** 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.
- QIAN, L. W. *et al.* Exacerbated and prolonged inflammation impairs wound healing and increases scarring. **Wound Repair Regen.**, v. 24, n. 1, p. 26-34, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/wrr.12381>>. Acesso em: 24 mar. 2021.
- RAHMAN, M. S., *et al.* Characterization of burn wound healing gel prepared from human amniotic membrane and Aloe vera extract. **BMC Complement Altern Med.**, v. 19, n. 1, p. 115, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12906-019-2525-5>>. Acesso em: 02 jan. 2021.
- RANA, M. M. *et al.* Amnion and collagen-based blended hydrogel improves burn healing efficacy on a rat skin wound model in the presence of wound dressing biomembrane. **Biomed Mater Eng.**, v. 31, n. 1, p. 1-17, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.3233/BME-201076>>. Acesso em: 02 jan. 2021.
- RANJBAR, R.; TAKHTFOOLADI, M. A. The effects of low level laser therapy on *Staphylococcus aureus* infected third-degree burns in diabetic rats. **Acta Cirurgica Brasileira [online]**, v. 31, n. 4, p. 250-255, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0102-865020160040000005>>. Acesso em: 02 jan. 2021.

RATHNAKAR, B. *et al.* Regulation of cellular marker modulated upon irradiation of low power laser light in burn injured mice. **BioPhotonics Australasia**, p.100132Z, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1117/12.2242919>>. Acesso em: 02 jan. 2021.

RAVISHANKER, R.; BATH, A.S.; ROY, R. "Amnion Bank"--the use of long term glycerol preserved amniotic membranes in the management of superficial and superficial partial thickness burns. **Burns**. v. 29, n. 4, p. 369-374, 2003. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/s0305-4179\(02\)00304-2](https://doi.org/10.1016/s0305-4179(02)00304-2)>. Acesso em: 02 jan. 2021.

REGULSKI, M. J.; DANILKOVITCH, A; SAUNDERS, M. C. Management of a chronic radiation necrosis wound with lyopreserved placental membrane containing viable cells. **Clinical case reports**, v. 7, n. 3, p. 456, 2019.

RICHARDSON, R. J. *et al.* **Pesquisa social métodos e técnicas**. 3º Ed. [16. Reimp.]. São Paulo: Atlas, 2015.

SANT'ANNA, L. B. *et al.* Amniotic membrane application reduces liver fibrosis in a bile duct ligation rat model. **Cell Transplantation**, v. 20, p. 441-453, 2011.

SANT'ANNA, L. B. *et al.* Antifibrotic Effects of Human Amniotic Membrane Transplantation in Established Biliary Fibrosis Induced in Rats. **Cell Transplant**. v. 25, n. 12, p. 2245-2257, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.3727/096368916X692645>>. Acesso em: 02 fev. 2021.

SANTOS, J. V. Burden of Burns in Brazil from 2000 to 2014: A Nationwide Hospital-Based Study. **World J Surg.**, v. 41, n.8, p. 2006-2012, 2017 Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00268-017-3988-5>>. Acesso em: 02 fev. 2021.

SANTUZZI, C. H. *et al.* Uso combinado da laserterapia de baixa potência e da inibição da ciclooxigenase-2 na reepitelização de ferida incisional em pele de camundongos: um estudo pré-clínico. **An. Bras. Dermatol.**, v. 86, n. 2; p. 278-83, 2011.

SHAH, R.; SOWMYA, N. K; MEHTA, D. S. Amnion membrane for coverage of gingival recession: A novel application. **Contemporary Clinical Dentistry**, v. 5, n. 3, jul./sep. 2014.

SHAKESPEARE, P. Burn wound healing and skin substitutes. **Burns.**, v. 27, n. 5, p. 517-522, 2001.

SILINI, A. R. *et al.* Is Immune Modulation the Mechanism Underlying the Beneficial Effects of Amniotic Cells and Their Derivatives in Regenerative Medicine?. **Cell Transplantation**, v. 26, p. 531–539, 2017. Disponível em: <<https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.3727/096368916X693699>>. Acesso em: 14 maio 2019.

SMELTZER, S. C. *et al.* Brunner&Suddarth: **Tratado de enfermagem médico-cirúrgica**. 12ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUEIMADURAS. **Queimaduras**. Brasília: SBQ, 2015. Disponível em: <http://sbqueimaduras.org.br/queimaduras-conceito-e-causas/>. Acesso em: 15 abr. 2019.

STEEN, E. H. et al. The Role of the Anti-Inflammatory Cytokine Interleukin-10 in Tissue Fibrosis. **Adv Wound Care (New Rochelle)**, v. 9, n. 4, p. 184-198, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1089/wound.2019.1032>>. Acesso em: 22 mar. 2021.

TAMAMA, K.; KERPEDJIEVA, S. S. Acceleration of Wound Healing by multiple growth factors and cytokines secreted from multipotential stromal cells/mesenchymal stem cells. **Wound Healing Society**, v. 1, n. 4, p. 177–182, 2011. doi: [10.1089/wound.2011.0296](https://doi.org/10.1089/wound.2011.0296)

TAVARES, W. S.; SILVA, R. S. Curativos utilizados no tratamento de queimaduras: uma revisão integrativa. **Rev Bras Queimaduras**, v. 14, n. 4, p. 300-306, 2015. Disponível em: rbqueimaduras.org.br/export-pdf/282/v14n4a11.pdf. Acesso em: 26 jan. 2021.

TER HORST, B. *et al.* Advances in keratinocyte delivery in burn wound care. **Advanced drug delivery reviews**, v. 123, p. 18-32, 2018.

TORTORA, G. J.; DERRICKSON, B. **Princípios de anatomia e fisiologia**. 14. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.

TRAJANO, E. T. *et al.* Low-level red laser improves healing of second-degree burn when applied during proliferative phase. **Lasers Med Sci.**, v. 30, n. 4, p. 1297-304, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10103-015-1729-2>>. Acesso em: 02 jan. 2021.

VAGHARDOOST, R. *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.**, v. 33, n. 3, p. 603-607, 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **BURNS fact sheet**. Geneva: World Health Organization; updated 2018. Disponível em: <<http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/burns>>. Acesso em: 03 jan. 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Management of Burns**. Geneva: World Health Organization, 2013. Disponível em: <https://www.who.int/surgery/publications/Burns_management.pdf>. Acesso em: jan 2021.

YADAV, A. *et al.* 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**. v. 186, p. 152-159, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.07.008>>. Acesso em: 02 jan. 2021.

YASUKAWA, A. *et al.* The Effect of low reactive-level laser therapy (LLLT) with helium-neon laser on operative wound healing in a rat model. **J. Vet. Med. Sci**, v. 69, n. 8, p. 799-806, 2007.

ZHANG, K. *et al.* Delayed application of silver nanoparticles reveals the role of early inflammation in burn wound healing. **Sci Rep.**, v. 10, n. 1, p. 6338, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-020-63464-z>>. Acesso em: 05 jan. 2021.

ZHANG, X. *et al.* Association of increasing burn severity in mice with delayed mobilization of circulating angiogenic cells. **Arch Surg**. v. 145, n. 3, p. 259-66. 2010.

APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Prezada participante,

Convido você a participar da pesquisa que tem como título **“Terapia a laser de baixa intensidade e membrana amniótica humana aplicadas em um modelo experimental de queimadura”** desenvolvida pela pesquisadora Fernanda Cláudia Miranda Amorim docente do curso de Bacharelado em Enfermagem do Centro Universitário UNINOVAFAP, sob a orientação da professora doutora Emilia Ângela Lo Schiavo Arisawa.

Trata-se de uma pesquisa de Doutorado em Engenharia Biomédica da Universidade do Vale do Paraíba. O objetivo geral deste estudo é: Avaliar o processo de reparo tecidual em queimaduras experimentais de espessura parcial superficial após aplicação da Terapia à Laser de Baixa Intensidade e Membrana Amniótica Humana, isoladamente e em associação. E os objetivos específicos são: Avaliar os aspectos macroscópicos da evolução do processo de reparo de lesões por queimadura: coloração da pele, flictenas e presença de crosta; verificar os aspectos microscópicos qualitativos da evolução do processo de reparo de lesões por queimadura quanto a presença e características do infiltrado inflamatório, fibroblastos, vasos sanguíneos, edema e organização das fibras colágenas; avaliar os aspectos microscópicos quantitativos da evolução do processo de reparo de lesões por queimadura quanto a contagem das médias de células inflamatórias e de fibroblastos; quantificar o colágeno tipo I e tipo III das lesões por queimaduras nos grupos experimentais estudados; comparar as terapias no processo de reparo tecidual de lesões por queimadura de contato.

O convite a sua participação nesta pesquisa se dá pela necessidade de desenvolver mais estudos científicos sobre produtos a serem utilizados em queimaduras. Sua participação é muito importante e consiste em autorizar o uso de sua placenta, que é um órgão utilizado apenas na gestação e que será descartado após o parto. Ressaltamos que sua participação é voluntária, isto é, ela não é obrigatória, e você tem plena autonomia para decidir se quer ou não participar. Você não será penalizado caso decida não participar da pesquisa ou, tendo aceitado, desistir desta.

Serão garantidas a confidencialidade e a privacidade sobre sua participação. Além disso, conforme a Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CNS), sua participação se dará em total anonimato, onde sua identidade ficará em sigilo e as informações coletada do seu prontuário serão transcritas e armazenadas, em arquivos digitais, mas somente terão acesso às

estas as pesquisadoras. Ao final da pesquisa, todo material será mantido em arquivo, por pelo menos 5 anos.

A qualquer momento, durante a pesquisa, ou posteriormente, você poderá solicitar do pesquisador informações sobre a pesquisa, o que poderá ser feito por meio do contato explicitado neste Termo. Você poderá contatar a pesquisadora responsável Fernanda Cláudia Miranda Amorim (086) 9982-1399, no endereço: Rua Vitorino Orthiges Fernandes, 6123 – Uruguai, CEP: 64073-505 - Teresina – Piauí, Tel: (086) 2106-0738 e-mail: famorim@uninovafapi.edu.br

Esta pesquisa apresenta riscos mínimos para as participantes como medo e quebra de sigilo, no entanto as pesquisadoras se comprometem em manter a ética, o sigilo das informações coletadas e o acesso das informações restrito apenas as pesquisadoras, bem como os resultados divulgados em artigos científicos.

O estudo será iniciado mediante sua autorização e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido em obediência aos preceitos que rege a Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde que trata de pesquisas envolvendo seres humanos.

O estudo possui benefícios indiretos e em longo prazo, uma vez que os resultados da pesquisa permitirão o conhecimento sobre os efeitos da membrana e do laser na cicatrização de queimaduras, também poderá contribuir com o avanço tecnológico no tratamento das queimaduras, pretende-se, com este estudo, avaliar a eficácia da membrana amniótica associada ao Terapia à Laser de Baixa Intensidade no processo de reparo tecidual de queimaduras de segundo grau. Os benefícios consistirão ainda, na divulgação científica dos resultados do estudo por meio de publicações,

Este estudo tem relevância por ampliar o conhecimento dos profissionais de saúde acerca das propriedades que a Membrana Amniótica Humana oferece para o tratamento de queimaduras, bem como o conhecimento para a comunidade científica sobre os benefícios da Membrana Amniótica Humana associada ao Terapia à Laser de Baixa Intensidade.

Os resultados serão divulgados, exclusivamente com finalidade científica, por meio da defesa pública deste trabalho, posteriormente, serão publicados em revistas científicas nacionais e/ou internacionais. Este termo será redigido em duas vias, sendo uma para o participante e outra para o pesquisador, sendo assinado e rubricado pelas pesquisadoras e com as páginas identificadas.

Ressalta-se que, conforme a Resolução 466/12 do CNS, os participantes da pesquisa que vierem a sofrer qualquer tipo de dano previsto ou não no termo de consentimento e resultante de sua participação no estudo, além do direito à assistência integral, têm direito à indenização.

Em caso de dúvida quanto à condução ética do estudo, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do UNINOVAFAPI, no endereço: Rua Vitorino Orthiges Fernandes, 6123 – Uruguai, CEP: 64073-505 - Teresina – Piauí, telefone: (086) 2106-0738, e-mail: cep@uninovafapi.edu.br. O Comitê de Ética em Pesquisa é a instância que tem por objetivo defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade e para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos. “Dessa forma o comitê tem o papel de avaliar e monitorar o andamento do projeto de modo que a pesquisa respeite os princípios éticos de proteção aos direitos humanos, da dignidade, da autonomia, da não maleficência, da confidencialidade e da privacidade.”

<hr/> Fernanda Cláudia Miranda Amorim (Pesquisadora Responsável)	<hr/> Emilia Ângela Lo Schiavo Arisawa (Pesquisadora Assistente)
--	--

Teresina, ____/____/ 2016.

Declaro que entendi os objetivos e condições da minha participação na pesquisa e concordo voluntariamente em participar. Por favor, assine ao final deste documento, em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador.

(Assinatura do participante da pesquisa)

Nome legível do participante:
CPF:

Amniotic membrane applied to burns healing: Pre-clinical study

Membrana amniótica aplicada na cicatrização de queimaduras: Estudo pré-clínico

Membrana amniótica aplicada en la curación de quemaduras: Un estudio preclínico

Received: 03/25/2021 | Reviewed: 04/03/2021 | Accept: 04/04/2021 | Published: 04/15/2021

Fernanda Cláudia Miranda Amorim

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1648-5298>
Centro Universitário UNINOVAFAP, Brazil
Universidade do Vale do Paraíba, Brazil
E-mail: fernanda.amorim@uninovafapi.edu.br

Emília Ângela Loschiavo Arisawa

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3526-3890>
Universidade do Vale do Paraíba, Brazil
E-mail: mirela@univap.br

Luciana Barros Sant'Anna

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5128-7414>
Universidade do Vale do Paraíba, Brazil
E-mail: lucianabsa@gmail.com

Khetyma Moreira Fonseca

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3722-4975>
Universidade Federal do Ceará, Brazil
E-mail: ketyrna_mf@hotmail.com

Davidson Ribeiro Costa

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9750-5675>
Universidade do Vale do Paraíba, Brazil
E-mail: dnribcosta@hotmail.com

Ana Beatriz Mendes Rodrigues

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8066-0022>
Universidade Federal do Piauí, Brazil
E-mail: anabeatriz_rodrigues@hotmail.com

Jancineide Oliveira de Carvalho

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7220-426X>
Centro Universitário UNINOVAFAP, Brazil
E-mail: jdolicar2@hotmail.com

Abstract

This preclinical study aimed to evaluate the tissue repair process of burns treated with human amniotic membrane (hAM) patches in rats. Twenty-four rats were subjected to superficial burns of partial thickness, and randomly allocated into two groups: Control and Treated Group, subdivided into two experimental periods of 7th and 14th days. The lesions were evaluated by digitalized images (macroscopy) and by the analysis of histological sections stained in H&E to quantify the number of inflammatory cells and fibroblasts present in the different experimental times (histomorphometry). The histomorphometric analyses were performed blindly. Statistical analysis employed Kolmogorov-Smirnov and Mann Whitney tests, with 95% confidence interval at 5% significance level ($p < 0.05$). Macroscopically, the lesions of Treated group presented a crust formation before Control Group, and there were no signs of infection in both groups. Microscopically, the qualitative analysis showed a faster evolution in the healing process of the Treated groups compared to the Control, with reduction of the inflammatory infiltrate, intense fibroblasts proliferation and better organization of the collagen fibers. The quantitative analysis showed statistically significant results regarding the reduction of inflammatory cells ($p < 0.0001$) at 7th and 14th day and increased proliferation of fibroblasts at 14th day ($p < 0.0001$) in lesions treated with hAM compared to Control group. The results of this preclinical study demonstrated that the application of hAM patches reduces the inflammatory process and accelerates the onset of the proliferative phase in burn injuries.

Keywords: Burns; Amnion; Wound healing; Skin; Rats; Biomedical engineering.

Resumo

Este estudo pré-clínico teve como objetivo avaliar o processo de reparo tecidual de queimaduras tratadas com fragmentos de membrana amniótica humana (MAH) em ratos. Vinte e quatro ratos foram submetidos a queimaduras de espessura parcial superficial, e alocados aleatoriamente em dois grupos: Grupo Controle e Tratado, subdivididos em dois períodos experimentais de 7º e 14º dias. As lesões foram avaliadas por imagens digitalizadas (macroscopia) e pela análise de cortes histológicos corados em H&E para quantificar o número de células inflamatórias e fibroblastos presentes nos diferentes tempos experimentais (histomorfometria). As análises histomorfométricas foram realizadas às

02/06/2021

ScholarOne Manuscripts

 Revista Latino-Americana de Enfermagem

 Home

 Author

Submission Confirmation

 Print

Thank you for your submission

Submitted to

Revista Latino-Americana de Enfermagem

Manuscript ID

RLAE-2021-5552

Title

ESTUDO PRÉ-CLÍNICO DE QUEIMADURAS EXPERIMENTAIS TRATADAS COM FOTOBIMODULAÇÃO E MEMBRANA AMNIÓTICA HUMANA, ISOLADAS E ASSOCIADAS.

Authors

Miranda Amorim, Fernanda Cláudia
Arisawa, Emilia Ângela
Sant'Anna, Luciana
Rodrigues, Ana Beatriz
Costa, Davidson

Date Submitted

02-Jun-2021

[Author Dashboard](#)



**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS -
CEUA UNINOVAFAP**

Protocolo nº 005P/V2/2017 - Pesquisa

PARECER DO COLEGIADO

Certificamos que a proposta intitulada MEMBRANA AMNIÓTICA HUMANA E TERAPIA A LASER DE BAIXA INTENSIDADE APLICADAS EM QUEIMADURAS DE SEGUNDO GRAU, sob a responsabilidade da pesquisadora **MsC Fernanda Cláudia Miranda Amorim**, juntamente com os colaboradores MsC Jancineide Oliveira de Carvalho e Edna Silva Cantanhede, foi **aprovada** em plenária da CEUA por estar em concordância com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controla da Experimentação Animal - CONCEA, em reunião do dia 25/04/2018.

Teresina, 03 de outubro de 2017


Fernanda Luiz Lima de Oliveira
Coordenador da CEUA UNINOVAFAP

Prof Dr Fernando Luiz Lima de Oliveira
Médico Veterinário CRMV 370 PI
Coordenador da CEUA UNINOVAFAP

ANEXO D - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP)

UNIVERSIDADE DO VALE DO
PARAÍBA - UNIVAP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Membrana amniótica humana na terapia regenerativa

Pesquisador: Luciana Barros Sant Anna

Área Temática:

Versão: 5

CAAE: 53933416.9.0000.5503

Instituição Proponente: Fundação Valeparaibana de Ensino

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.077.418

Apresentação do Projeto:

projeto já foi apreciado e aprovado

Objetivo da Pesquisa:

Não foram alterados

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não foram alterados

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

projeto foi avaliado e reenviado para acréscimo de integrantes da equipe executora.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Não foram alterados

Recomendações:

Nenhuma

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Os novos integrantes da equipe executora forma inseridos corretamente no projeto e TCLE.

Considerações Finais a critério do CEP:

CEP-Univap alerta que, segundo a Resolução 466/12 (item XI), cabe ao pesquisador "elaborar e apresentar os relatórios parciais e final", sendo esta uma responsabilidade "indelével e indeclinável"

Endereço: Av. Shishima Hifumi, 2911

Bairro: Urbanova

CEP: 12.244-000

UF: SP

Município: SAO JOSE DOS CAMPOS

Telefone: (12)3947-1111

Fax: (12)3947-1149

E-mail: cep@univap.br

Continuação do Parecer: 2 077.418

e compreende os aspectos éticos e legais". A Resolução 510/16, no art. 28, V, reforça que cabe ao pesquisador "apresentar no relatório final que o projeto foi desenvolvido conforme delineado, justificando, quando ocorridas, a sua mudança ou interrupção."

Segundo a carta circular n. 0226/CONEP/CNS, de 2010, o relatório final deve incluir:

- Dados do projeto: Registro CONEP e
- Título do Projeto e Dados dos participantes: total de participantes recrutados, incluídos, selecionados, excluídos, retirados/descontinuados, concluintes (em cada centro, se for o caso, e no total). Ocorrendo participantes retirados/descontinuados, indicar principais razões disto. Ocorrendo "eventos sérios", indicar as condutas adotadas. Se houve pedido de indenização por danos causados por este estudo, indicar qual o dano e conduta tomada.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_920929E2.pdf	16/05/2017 07:52:14		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Brochura_LUCIANA_2017_cep.doc	16/05/2017 07:47:52	Luciana Barros Sant Anna	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Luciana_maio_2017.docx	16/05/2017 07:46:34	Luciana Barros Sant Anna	Aceito
Outros	PROTOCOLO2ProfaLucianaUNIVAP.pdf	23/09/2016 17:20:57	Luciana Barros Sant Anna	Aceito
Outros	PROTOCOLO1AProfaLucianaUNIVAP.pdf	23/09/2016 17:18:52	Luciana Barros Sant Anna	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Autorizacao_Placenta_Hospital_atualizado.pdf	23/05/2016 11:12:04	Luciana Barros Sant' Anna	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.docx	04/03/2016 21:44:17	Luciana Barros Sant' Anna	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av. Shishima Hifumi, 2911

Bairro: Urbanova

CEP: 12.244-000

UF: SP

Município: SAO JOSE DOS CAMPOS

Telefone: (12)3947-1111

Fax: (12)3947-1149


E-mail: cep@univap.br

UNIVERSIDADE DO VALE DO
PARAÍBA - UNIVAP



Continuação do Parecer: 2.077.418

SAO JOSE DOS CAMPOS, 23 de Maio de 2017


Assinado por:
Mauricio Martins Alves
(Coordenador)

Endereço: Av. Shishima Hifumi, 2911
Bairro: Urbanova CEP: 12.244-000
UF: SP Município: SAO JOSE DOS CAMPOS
Telefone: (12)3947-1111 Fax: (12)3947-1149 E-mail: cep@univap.br