

Universidade do Vale do Paraíba
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica

Débora Campos Chaves Correia

**ANÁLISE MULTIESCALA DA FOTOBIMODULAÇÃO E MEMBRANA
AMNIÓTICA NO REPARO MEDULAR: DA PRESERVAÇÃO DA MIELINA À
RECUPERAÇÃO CINÉTICA**

**MULTISCALE ANALYSIS OF PHOTOBIMODULATION AND AMNIOTIC
MEMBRANE IN SPINAL CORD REPAIR: FROM MYELIN PRESERVATION TO
KINETIC RECOVERY**

São José dos Campos, SP
2026

Débora Campos Chaves Correia

**ANÁLISE MULTIESCALA DA FOTOBIMODULAÇÃO E MEMBRANA
AMNIÓTICA NO REPARO MEDULAR: DA PRESERVAÇÃO DA MIELINA À
RECUPERAÇÃO CINÉTICA**

Tese de doutorado defendida no 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.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Emilia Angela Lo Schiavo
Arisawa
Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Luciana Barros
Sant'Anna

São José dos Campos, SP
2026

TERMO DE AUTORIZAÇÃO DE DIVULGAÇÃO DA OBRA

Ficha catalográfica

Correia, Débora Campos Chaves
Análise multiescala da fotobiomodulação e membrana amniótica
no reparo medular : da preservação da mielina à recuperação
cinética / Débora Campos Chaves Correia; orientadora, Emilia
Angela Lo Schiavo Arisawa ; co-orientadora Luciana Barros
Sant'Anna. - São José dos Campos, SP, 2026.
1 CD-ROM, 138 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. Membrana amniótica. 3.
Neuroproteção. 4. Fotobiomodulação. 5. Lesão medular. I. Arisawa
, Emilia Angela Lo Schiavo, orient. II. Sant'Anna, Luciana
Barros, co-orient. III. Universidade do Vale do Paraíba. Programa
de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica. IV. Título.

Eu, Débora Campos Chaves Correia, autor(a) 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, 24 de Abril de 2026.



Autor(a) da Obra

Data da defesa: 06 / 03 / 2026

DÉBORA CAMPOS CHAVES CORREIA

**“ANÁLISE MULTIESCALA DA FOTOBIMODULAÇÃO E MEMBRANA AMNIÓTICA NO REPARO
MEDULAR: DA PRESERVAÇÃO DA MIELINA À RECUPERAÇÃO CINÉTICA.”**

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 Emilia Angela Lo Schiavo Arisawa	<i>Emilia A Lo Schiavo Arisawa</i>
Prof. ^a Dr. ^a Luciana Barros Sant'Anna	<i>Luciana Barros Sant'Anna</i>
Prof. ^a Dr. ^a Lúcia Vieira	<i>Lúcia Vieira</i>
Prof. ^a Dr. ^a Renata de Azevedo Canevari	<i>Renata de Azevedo Canevari</i>
Prof. ^a Dr. ^a Mafalda Laranjo – Universidade de Coimbra	<i>Mafalda Laranjo</i>
Prof. Dr. Rodrigo Labat Marcos - Uninove	<i>Rodrigo Labat Marcos</i>

Prof.^a Dr.^a Juliana Ferreira Strixino

Diretora do IP&D – Univap

São José dos Campos, 06 de março de 2026.

*Para que todos vejam, e saibam, e considerem, e juntamente entendam que a mão do **Senhor** fez isto.*

Isaías 41:20

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu marido, Victor, que esteve ao meu lado com amor, paciência e firmeza em cada etapa desta caminhada, sendo meu alicerce e meu porto seguro, sempre sonhando e acreditando comigo.

Aos meus pais, Marcio e Marcia, por serem minha base, meu exemplo e meu primeiro incentivo ao conhecimento, ensinando-me a nunca desistir, independentemente das adversidades.

Aos meus irmãos, Dara e Iago (meus fã's), que sempre acreditaram em mim e torceram por cada conquista.

Aos meus avós, cuja presença, mesmo distante, sempre foi força silenciosa e constante em minha trajetória.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por sustentar meus passos ao longo desta jornada, fortalecendo-me nos momentos de incerteza e renovando minha coragem diante dos desafios que o doutorado impôs.

Ao meu marido, **Victor**, pelo apoio constante durante esta etapa, pela compreensão diante das exigências acadêmicas e por dividir comigo as responsabilidades e os sonhos que tornaram possível a conclusão desta tese.

Aos meus pais, **Marcio e Marcia**, e aos meus irmãos, **Dara e Iago**, obrigada pelo incentivo contínuo, pela torcida constante e pelo carinho ao longo de toda esta trajetória.

À minha orientadora, **Prof.^a Dra. Emilia Angela Lo Schiavo Arisawa**, pela orientação rigorosa, pela confiança depositada em meu trabalho e por contribuir de maneira decisiva para minha formação científica. Sua exigência e comprometimento foram fundamentais para meu amadurecimento acadêmico e profissional. Agradeço a Deus pela sua vida.

À minha coorientadora, **Prof.^a Dra. Luciana Sant'Anna**, pelas contribuições valiosas, disponibilidade e dedicação no acompanhamento desta pesquisa.

À **Universidade do Vale do Paraíba – UNIVAP** e ao **Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento - IP&D**, pelo suporte institucional e infraestrutura disponibilizada para a execução desta pesquisa, estendendo meus agradecimentos aos profissionais técnicos e administrativos pelo apoio prestado ao longo deste período.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES** – Código de Financiamento 001, pelo apoio financeiro.

Aos colegas, colaboradores e participantes desta pesquisa, pelas discussões científicas, apoio técnico e contribuições que enriqueceram este estudo.

Por fim, agradeço a todos que, direta ou indiretamente, fizeram parte desta trajetória e contribuíram para que esta conquista se tornasse possível.

Definitivamente, palavras não expressariam todo o meu apreço por vocês.

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

A pesquisa visou impactar diretamente os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS), enfatizando a ODS 3 (Boa Saúde e Bem-estar). O impacto abrangeu diferentes áreas:

1) Científica e Técnica: O estudo contribui para o avanço do conhecimento na área de engenharia biomédica e medicina regenerativa fornecendo evidências pré-clínicas sobre a eficácia da fotobiomodulação (FBM) e da membrana amniótica (MA), isoladas ou combinadas, no reparo de lesões medulares. A pesquisa validou os protocolos de tratamento propostos, associando análises histológicas (qualitativas e quantitativas) a avaliações biomecânicas, incluindo a força de reação ao solo (FRS), por meio de uma metodologia integrada para investigar mecanismos de neuroproteção e de recuperação funcional locomotora.

2) Social: A lesão medular é uma condição debilitante que afeta predominantemente adultos jovens em idade produtiva, gerando severas consequências físicas, sociais e perda de independência. O impacto social desta pesquisa reside na busca por terapias que possam minimizar sequelas neurológicas, como a paraplegia, melhorando a qualidade de vida dos pacientes e reduzindo a sobrecarga sobre familiares e cuidadores.

3) Inovadora e Econômica: A pesquisa explora terapias de baixo custo e elevada viabilidade. A membrana amniótica é um biomaterial obtido de placentas humanas, frequentemente descartadas, transformando um resíduo biológico em um recurso terapêutico valioso. Paralelamente, a fotobiomodulação destaca-se como estratégia terapêutica não invasiva, de baixo custo e sem efeitos colaterais. O desenvolvimento desses protocolos pode reduzir significativamente os custos assistenciais de longo prazo, que atualmente podem chegar a milhões de dólares por paciente ao longo da vida.

4) Educacional e Cultural: O desenvolvimento deste trabalho no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da UNIVAP fomenta a formação de recursos humanos qualificados em técnicas avançadas de microscopia, bioengenharia e experimentação animal. Além disso, promove a cultura da doação de tecidos (placentas) para fins científicos, mediante o consentimento livre e esclarecido, educando a comunidade sobre a importância da pesquisa científica.

5) Internacionalização e Inserção Local: O estudo fortalece a inserção local por meio da parceria entre a universidade e a Santa Casa de São José dos Campos para a captação de placentas, integrando a pesquisa acadêmica à rede hospitalar regional. Simultaneamente, aborda um problema de saúde global, a lesão medular, cujos resultados possuem relevância internacional, alinhando-se a esforços mundiais para encontrar tratamentos neuroregenerativos eficazes.

6) Desenvolvimento Sustentável:

- **ODS 3 (Saúde e Bem-Estar):** Foco central da pesquisa, visando desenvolver protocolos de tratamento que reduzam a incapacidade física e permitam a recuperação de pacientes com traumas medulares.

- **ODS 9 (Indústria, Inovação e Infraestrutura):** Fomenta a inovação científica ao testar novos protocolos terapêuticos e tecnologias com biomateriais e fototerapia para a regeneração tecidual.

- **ODS 12 (Consumo e Produção Responsáveis):** Promove o uso sustentável de recursos biológicos ao reaproveitar a membrana amniótica da placenta humana, que seria descartada como lixo hospitalar, para fins terapêuticos.

- **ODS 4 (Educação de Qualidade):** Contribui para a educação superior e a capacitação técnica e científica de pesquisadores na área da saúde e engenharia.

POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

This research aimed to directly impact the Sustainable Development Goals (SDGs), emphasizing SDG 3 (Good Health and Well-being). The expected impact encompasses different areas:

1) Scientific and Technical: The study contributed to the advancement of knowledge in the field of biomedical engineering and regenerative medicine by providing preclinical evidence on the comparative efficacy of photobiomodulation (PBM) and amniotic membrane (AM), isolated or combined, in the repair of spinal cord injuries. The research validated the proposed treatment protocols, associating histological analyses (qualitative and quantitative) with biomechanical assessments, including ground reaction force (GRF), through an integrated methodology to investigate mechanisms of neuroprotection and locomotor functional recovery.

2) Social: Spinal cord injury is a debilitating condition that predominantly affects young adults of working age, generating severe physical and social consequences and loss of independence. The social impact of this research lies in the search for therapies that can minimize neurological sequelae, such as paraplegia, improving the quality of life of patients and reducing the burden on family members and caregivers.

3) Innovative and Economical: The research explores low-cost and highly viable therapies. The amniotic membrane is a biomaterial obtained from human placentas, which are frequently discarded, transforming a biological waste into a valuable therapeutic resource. In parallel, photobiomodulation stands out as a non-invasive, low-cost strategy without side effects. The development of these protocols can significantly reduce long-term healthcare costs, which can currently reach millions of dollars per patient over a lifetime.

4) Educational and Cultural: The development of this work in the Postgraduate Program in Biomedical Engineering at UNIVAP fosters the training of qualified human resources in advanced microscopy techniques, bioengineering, and animal experimentation. Furthermore, it promoted the culture of tissue (placenta) donation for scientific purposes, through free and informed consent, educating the community about the importance of scientific research.

5) Internationalization and Local Integration: The study strengthened local integration through the partnership between the university and the Santa Casa de São José dos Campos for the collection of placentas, integrating academic research into the regional hospital network. Simultaneously, it addressed a global health problem, spinal cord injury, whose results have international relevance, aligning with global efforts to find effective neuroregenerative treatments.

6) Sustainable Development:

- **SDG 3 (Health and Well-being):** Central focus of the research, aiming to develop treatment protocols that reduce physical disability and allow the recovery of patients with spinal cord injuries.

- **SDG 9 (Industry, Innovation and Infrastructure):** Fosters scientific innovation by testing new therapeutic protocols and technologies with biomaterials and phototherapy for tissue regeneration.

- **SDG 12 (Responsible Consumption and Production):** Promotes the sustainable use of biological resources by reusing the amniotic membrane of the human placenta, which would otherwise be discarded as hospital waste, for therapeutic purposes.

- **SDG 4 (Quality Education):** Contributes to higher education and the technical and scientific training of researchers in the fields of health and engineering.

RESUMO

As lesões medulares traumáticas (LM) representam uma condição clínica devastadora, com fisiopatologia complexa, que abrange eventos primários e secundários, culminando em déficits neurológicos severos, perdas funcionais permanentes e elevado impacto socioeconômico. Ante a escassez de terapias regenerativas definitivas, esta tese investigou estratégias terapêuticas inovadoras e de baixo custo com foco na fotobiomodulação (PBM) e na aplicação de fragmento da membrana amniótica (MA). O objetivo central foi avaliar e comparar a eficácia dessas terapias, isoladas ou associadas, no reparo de lesões medulares e na recuperação funcional locomotora. Utilizou-se um modelo experimental de lesão medular por contusão em 45 ratos Wistar, distribuídos nos grupos Controle (C), Lesão (L), PBM, MA e PBM+AM, subdivididos em dois tempos experimentais, 7 e 14 dias. A fotobiomodulação foi aplicada usando parâmetros específicos (808 nm, 72 J/cm², 100 mW, pontual, transcutânea, e em dias alternados), e o fragmento de MA (4 cm²) foi implantado com a face mesenquimal voltada para o tecido neural. Após 7 e 14 dias da lesão medular, realizou-se avaliação multiescala incluindo histomorfometria (Hematoxilina e Eosina e Luxol Fast Blue) para mensuração da área de cavitação e integridade da mielina, além da análise biomecânica da marcha via Força de Reação do Solo (FRS). A análise dos dados demonstrou que, na fase aguda (7 dias), todos os grupos tratados exibiram redução significativa na área de cavitação comparados ao grupo L, com superioridade estatística para a PBM isolada ($p < 0,05$). Na fase subaguda (14 dias), embora as diferenças morfométricas tenham se estabilizado entre os grupos tratados, a análise biomecânica revelou que o grupo PBM+AMII apresentou recuperação funcional significativamente superior ao grupo L ($p < 0,05$). Conclui-se que os protocolos propostos exerceram efeitos neuroprotetores relevantes, distintos e complementares: a fotobiomodulação demonstrou maior eficácia na modulação da fase aguda, enquanto a associação terapêutica mostrou-se fundamental para a otimização da recuperação funcional a longo prazo.

Palavras-chave: membrana amniótica; locomoção; neuroproteção; sistema nervoso; fotobiomodulação; lesão medular.

ABSTRACT

Traumatic spinal cord injuries (SCI) represent a devastating clinical condition with a complex pathophysiology encompassing primary and secondary events, culminating in severe neurological deficits, permanent functional losses, and a high socioeconomic impact. Given the scarcity of definitive regenerative therapies, this thesis investigated innovative and low-cost therapeutic strategies focusing on photobiomodulation (PBM) and the application of amniotic membrane fragments (AM). The central objective was to evaluate and compare the efficacy of these therapies, alone or in combination, in the repair of spinal cord injuries and in locomotor functional recovery. An experimental model of spinal cord injury by contusion was used in 45 Wistar rats, distributed into Control (C), Injury (L), PBM, AM, and PBM+AM groups, subdivided into two experimental time points, 7 and 14 days. Photobiomodulation was applied using specific parameters (808 nm, 72 J/cm², 100 mW, point-source, transcutaneous, and on alternate days), and the MA fragment (4 cm²) was implanted with the mesenchymal face facing the neural tissue. After 7 and 14 days of spinal cord injury, a multiscale evaluation was performed, including histomorphometry (Hematoxylin and Eosin and Luxol Fast Blue) to measure the cavitation area and myelin integrity, in addition to biomechanical gait analysis via Ground Reaction Force (GRF). Data analysis demonstrated that, in the acute phase (7 days), all treated groups exhibited a significant reduction in cavitation area compared to the L group, with statistical superiority for isolated PBM ($p < 0.05$). In the subacute phase (14 days), although morphometric differences stabilized between the treated groups, biomechanical analysis revealed that the PBM+AM group showed significantly superior functional recovery compared to the L group ($p < 0.05$). It is concluded that the proposed protocols exerted relevant, distinct, and complementary neuroprotective effects: photobiomodulation demonstrated greater efficacy in modulating the acute phase, while the therapeutic combination proved fundamental for optimizing long-term functional recovery.

Keywords: amniotic membrane; locomotion; neuroprotection; nervous system; photobiomodulation; spinal cord injury.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Representação da coluna vertebral e vértebra apresentando a medula espinhal em seu interior	21
Figura 2- Principais modelos experimentais de lesão medular (LM) descritos na literatura, distribuídos por espécie animal.	34
Figura 3- Esquema do delineamento experimental mostrando a distribuição dos animais nos grupos Controle (C), Lesão (L), PBM, MA e PBM+MA após indução de lesão medular por contusão.	47
Figura 4- Imagem de tomografia do rato (região torácica)	48
Figura 5- Procedimento experimental demonstrando rato sob anestesia inalatória com isoflurano e exposição da medula espinhal, etapa preparatória para protocolo de indução de lesão medular (LM).	49
Figura 6- Etapas do procedimento cirúrgico para indução experimental de lesão medular em modelo murino.	50
Figura 7- Esquema representativo ilustrando os pontos de aplicação da fotobiomodulação ao longo da lesão medular, indicando o ponto inicial (A) e o ponto final (B).	51
Figura 8 - Coleta e processamento da Membrana Amniótica	54
Figura 9- Simulação experimental representando um animal com a medula espinhal exposta e a aplicação de fragmento da membrana amniótica diretamente sobre a área da lesão.	54
Figura 10- Esquema ilustrativo da configuração experimental utilizada para a mensuração da força de reação do solo.	62
Figura 11- Esquema ilustrativo do delineamento experimental e aplicação dos tratamentos	63
Figura 12- Fotomicrografias dos cortes da medula espinhal avaliando a morfologia tecidual nos grupos de 7 dias. À esquerda, Hematoxilina & Eosina (H&E) para avaliação da arquitetura celular geral; à direita, Luxol Fast Blue (LFB) associado à Hematoxilina.	67
Figura 13- Gráfico comparativo da porcentagem das áreas de cavitação em cada grupo com indicativo de significância estatística entre os grupos controle e tratados (__ __) e lesão e tratados (___) – 7 dias.	69
Figura 14- Gráficos de Força de reação de solo dos grupos eutanasiados em 7 dias, em Newtons (N), dos grupos C, L, AM, PBM e PBM+AM, apresentando os dados de coletados aos 0, 3 e 7 dias de análise de FRS	71
Figura 15- Análise estatística dos valores de significância (p-valor) das comparações entre grupos na avaliação biomecânica (FRS) aos 7 dias.	72
Figura 16 - Fotomicrografias dos cortes da medula espinhal avaliando a morfologia tecidual nos grupos de 14 dias. À esquerda, Hematoxilina & Eosina (H&E) para avaliação da arquitetura celular geral; à direita, Luxol Fast Blue (LFB) associado à Hematoxilina para evidenciar a integridade das bainhas de mielina (em azul). (*) indica áreas de cavitação cística decorrentes de necrose tecidual; (x) indica a disposição das fibras nervosas.	75

Figura 17- Gráfico comparativo da porcentagem das áreas de cavitação em cada grupo com indicativo de significância estatística entre os grupos controle e tratados (___) e lesão e tratados (___) – 14 dias.	78
Figura 18 - Gráficos de Força de reação de solo dos grupos C, L II, AM II, PBM II e PBM + AM II eutanasiados 14 dias pós LM, em Newtons (N), apresentando os dados de coletados aos 0, 7 e 14 dias de análise de FRS	80
Figura 19- Análise estatística dos valores de significância (p-valor) das comparações entre grupos na avaliação biomecânica (FRS) aos 14 dias.	81
Figura 20- Representação da Força de Reação do Solo (FRS) durante a marcha dos animais nos períodos de 7 e 14 dias após a lesão medular. Os gráficos apresentam a distribuição da força aplicada ao solo em função do tempo de contato do membro posterior, compilando os dados de todos os grupos experimentais em cada período avaliado.	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Descrição detalhada dos parâmetros adotados para a aplicação da fotobiomodulação (PBM).....	52
Tabela 2- Análise Estatística das Diferenças entre os Grupos C, I, PBM, AM E PBM+AM (7 dias) por Meio do Teste de Comparações Múltiplas de Tukey, Evidenciando as Relações Significativas entre os Tratamentos	70
Tabela 3- Análise Estatística das Diferenças entre os Grupos C, I, PBM, AM E PBM+AM (14 dias) por Meio do Teste de Comparações Múltiplas de Tukey, Evidenciando as Relações Significativas entre os Tratamentos	78

LISTA DE ESQUEMA

Esquema 1- Passo a passo do procedimento realizado no software ImageJ para a mensuração da área	58
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AANS	<i>American Association of Neurological Surgeons</i>
ATLS	Advanced Trauma Life Support - Suporte Avançado de Vida no Trauma
C	Controle
CNS	<i>Congress of Neurological Surgeons</i>
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal.
EDTA	Etileno Diamino Tetra Acetato
FBM	Fotobiomodulação
FRS	Força de Reação do Solo
H&E	Hematoxilina e Eosina
L	Grupo Lesão
LII	Grupo Lesão II
LFB	Luxol Fast Blue
LM	Lesão Medular
MA	Membrana Amniótica
MAII	Membrana Amniótica II
ME	Medula Espinhal
PAM	Pressão Arterial média
PBM	Fotobiomodulação
PBM II	Fotobiomodulação II
PBM+AM	Fotobiomodulação + Membrana Amniótica
PBM+AM II	Fotobiomodulação + Membrana Amniótica II
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UTI	Unidade de Terapia Intensiva

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1 Medula Espinhal	21
2.2 Lesão Medular	24
2.2.1 Fisiopatologia: Fases da Lesão Primária e Secundária	28
2.3 Tratamentos Atuais e Manejo Clínico da Lesão Medular	29
2.3.1 Descompressão Cirúrgica e Estabilização	29
2.3.2 Manejo Hemodinâmico e a Controvérsia dos Corticoides	30
2.4 Avanços e Novas Perspectivas Terapêuticas: Da Neuroproteção à Regeneração	30
2.4.1 Neuroproteção Farmacológica Avançada	31
2.4.2 Engenharia de Tecidos e o Potencial da Membrana Amniótica	31
2.4.3 Fotobiomodulação (FBM): Mecanismos Biofísicos e Celulares	32
2.4.4 Estratégias Combinatórias	33
2.5 Modelos animais em lesões medulares	33
2.6 Fotobiomodulação	35
2.7 Membrana Amniótica	37
2.8 Análise de movimento - Força de Reação do Solo	39
3 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO	41
4 HIPÓTESES	42
5 OBJETIVO	43
5.1 Objetivo Geral	43
5.2 Objetivos específicos	43
6 MATERIAL E MÉTODOS	44
6.1 Desenho Experimental	44
6.2 Aspectos Éticos do Estudo	44
6.3 Local de Estudo	44
6.4 Amostra	45
6.5 Grupos do Estudo	45
6.6 Protocolo Anestésico	47
6.7 Procedimentos Cirúrgicos	48
6.8 Protocolos de tratamento	51
6.8.1 Fotobiomodulação (FBM)	51
6.8.2 Membrana Amniótica	52
6.9 Protocolo de eutanásia	55
6.10 Processamento Histológico	55

6.11 Análise Microscópica.....	56
6.12 Procedimentos para quantificação dos dados	57
6.13 Análise de movimento	61
6.14 Análise Estatística.....	64
7 RESULTADOS.....	65
7.1 Tempo Experimental – 7 DIAS.....	65
7.1.1 Análise Qualitativa	65
7.1.2 Análise Quantitativa.....	69
7.1.3 Análise de Movimento.....	70
7.2 Tempo Experimental – 14 DIAS.....	73
7.2.1 Análise Qualitativa	73
7.2.2 Análise Quantitativa.....	77
7.2.3 Análise de Movimento.....	78
8 DISCUSSÃO	85
9 CONCLUSÃO	96
REFERÊNCIAS.....	97
ANEXO A - COMPROVANTE DE APROVAÇÃO DO PROJETO	108
ANEXO B – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	114
ANEXO C – PRODUÇÃO ACADÊMICA	115
APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	120
APÊNDICE B	122
APÊNDICE C	127

1 INTRODUÇÃO

Lesões medulares (LMs) constituem uma das condições mais debilitantes na clínica neurológica, caracterizadas por danos à medula espinhal que causam alterações temporárias ou permanentes em sua função. Esses danos, frequentemente, resultam em disfunção neurológica significativa (Ahuja *et al.*, 2017a). Dessa forma, as LMs comprometem a qualidade de vida, pelos prejuízos na independência e na capacidade de trabalho dos indivíduos afetados, além de gerarem custos substanciais para tratamento, que podem alcançar entre US\$ 1,1 e 4,6 milhões por paciente ao longo da vida, segundo publicação do Centro Estatístico Nacional de Lesões Medulares (National Spinal Cord Injury Statistical Center- NSCISC, 2025).

Estima-se que, globalmente, cerca de 2,5 milhões de pessoas vivam com LM, com a ocorrência anual de 250.000 a 500.000 novos casos (Cripps *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2010; Khan; Ahmed, 2022). Apesar dos avanços nos cuidados médicos e cirúrgicos, ainda não existem terapias efetivas capazes de promover o reparo funcional da medula espinhal (Ahuja *et al.*, 2017b; Souza *et al.*, 2013). Embora diversas estratégias neuroprotetoras e neuroregenerativas tenham avançado de estudos pré-clínicos para ensaios clínicos nas últimas décadas, nenhuma abordagem terapêutica padrão foi universalmente estabelecida, reforçando a necessidade de novas alternativas terapêuticas (Anjum *et al.*, 2020; Baptiste; Fehlings, 2007; Venkatesh *et al.*, 2019).

As LMs podem ser classificadas em traumáticas e não traumáticas. As lesões traumáticas decorrem de impactos físicos externos, como acidentes automobilísticos, quedas, práticas esportivas ou violência, enquanto as não traumáticas estão associadas a condições patológicas, como tumores, infecções ou doenças degenerativas (Ahuja *et al.*, 2017a, 2017b). Independentemente da etiologia, a lesão inicial desencadeia uma complexa cascata de eventos secundários, que agravam o dano tecidual e contribuem para déficits neurológicos permanentes (Anjum *et al.*, 2020; Venkatesh *et al.*, 2019). Entre as principais consequências clínicas das LMs destacam-se a paraplegia ou quadriplegia, disfunções autonômicas, perda do controle vesical e intestinal, disfunção sexual, dor crônica e disreflexia autonômica, comprometendo severamente a qualidade de vida dos pacientes (Alizadeh; Dyck; Karimi-Abdolrezaee, 2019; Paiva *et al.*, 2023).

Nesse contexto, a pesquisa científica básica utilizando modelos animais de LM tem desempenhado papel fundamental na compreensão dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos e no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas (Fan *et al.*, 2018; Fan; Wei; Feng, 2022). Entre as abordagens investigadas, a fotobiomodulação (FBM), por meio do uso de laser de baixa intensidade (LBI), tem demonstrado resultados promissores no tratamento de doenças neurológicas e lesões do sistema nervoso periférico, incluindo LM. A FBM atua por meio da ativação de mecanismos fotobioestimulantes, favorecendo a regeneração tecidual, modulação da resposta inflamatória, alívio de desconfortos pós-operatórios e melhora da recuperação funcional (Andraus; Barbieri; Mazzer, 2010; Naeser; Hamblin, 2015; Salehpour *et al.*, 2018).

Paralelamente, a membrana amniótica (MA) tem se destacado como um biomaterial de interesse em protocolos terapêuticos inovadores, devido às suas propriedades anti-inflamatórias, antifibróticas e à capacidade de atuar como substrato favorável à proliferação e diferenciação celular, contribuindo para a redução de cicatrizes e para a preservação tecidual após lesões (Leal-Marin *et al.*, 2021). Embora ambas as terapias apresentem potencial terapêutico quando aplicadas isoladamente, a associação entre FBM e MA no contexto das lesões medulares ainda permanece pouco explorada.

Para uma avaliação mais abrangente da recuperação funcional após lesão medular experimental, torna-se essencial integrar análises estruturais a parâmetros biomecânicos objetivos. Nesse sentido, a análise da Força de Reação do Solo (FRS) surge como uma ferramenta quantitativa robusta para a avaliação do desempenho locomotor, superando limitações de métodos puramente observacionais. Fundamentada na Terceira Lei de Newton, a FRS permite caracterizar a interação dinâmica entre o sistema musculoesquelético e o ambiente, fornecendo informações detalhadas sobre suporte de peso, estabilidade postural e padrões cinéticos da marcha, possibilitando a detecção de alterações funcionais sutis decorrentes da lesão e das intervenções terapêuticas (Beloni *et al.*, 2025a; Correia *et al.*, 2025a).

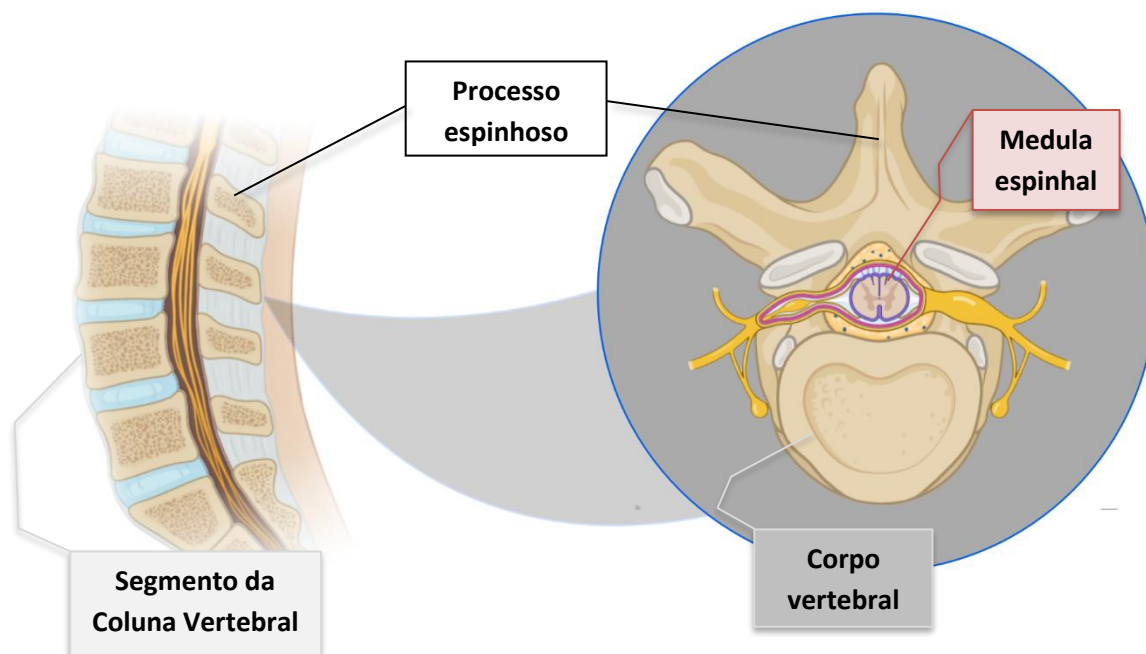
Considerando o exposto, esta pesquisa visa explorar protocolos terapêuticos inovadores que permitam melhorar significativamente a qualidade de vida e a independência dos pacientes com LM, avaliando os efeitos da aplicação da MA e FBM, isoladas ou em associação, na fase inicial do processo de reparo tecidual de LM induzida em ratos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Medula Espinhal

A medula espinhal é uma estrutura vital do Sistema Nervoso Central (SNC), responsável pela transmissão de informações motoras e sensoriais entre o cérebro e sistema nervoso periférico, controlando o tronco e musculatura dos membros, bem como recebendo informações sensoriais dessas regiões (Tan; Faull; Curtis, 2023). Localiza-se no interior da coluna vertebral, estrutura anatômica que sustenta o tronco e protege a medula espinhal e as raízes nervosas, dentro do canal vertebral, protegida pelas vértebras (Figura 1), que variam em estrutura e função, estendendo-se do forame magno até a primeira ou segunda vértebra lombar (Burns *et al.*, 2012; Moore; Dalley; Agur, 2014). A medula espinhal é uma estrutura anatomicamente complexa que, para ser explicada, pode ser dividida por sua anatomia, fisiologia e histologia.

Figura 1- Representação da coluna vertebral e vértebra apresentando a medula espinhal em seu interior



Fonte: Elaborado pelo autor.

Anatomicamente, a coluna vertebral é dividida em cinco segmentos principais: cervical, torácico, lombar, sacral e coccígea. Essas regiões facilitam o controle motor

e sensorial de diferentes partes do corpo. A região cervical é responsável pelos movimentos e pela sensibilidade da cabeça, do pescoço, dos ombros, dos braços e das mãos, sendo a região mais vulnerável a lesões traumáticas, que podem ser particularmente graves e até fatais, enquanto a região torácica é responsável pelo controle motor e sensorial do tórax, do abdômen superior e da parte superior das costas, desempenhando papel importante na estabilidade do tronco. A região lombar relaciona-se ao controle motor e sensorial da parte inferior do abdômen e das pernas, enquanto a região sacral controla as funções motoras e sensoriais das pernas, bem como o funcionamento dos órgãos pélvicos, como bexiga e intestinos, e a coccígea está envolvida, principalmente, no controle motor e sensorial das áreas ao redor da região pélvica inferior e coccígea (Hermes *et al.*, 2023). Cada uma dessas regiões possui funções motoras e sensoriais distintas, fornecendo controle especializado sobre diferentes partes do corpo, com impacto direto dependendo da localização de eventuais lesões.

A medula espinhal tem início na medula oblonga, porção mais caudal do tronco encefálico, e termina no nível da primeira ou segunda vértebra lombar (L1-L2). Após esse ponto, ela se afina para formar o cone medular e, as raízes nervosas que se estendem abaixo, formam a cauda equina, uma coleção de raízes nervosas que continua pelo canal vertebral até o cóccix (Bican; Minagar; Pruitt, 2013). A medula espinhal é revestida por três meninges de tecido conjuntivo, dura-máter, aracnoide e a pia-máter, e macroscopicamente podem ser visualizadas duas regiões denominadas substâncias branca e cinzenta. Em secção transversal, a substância cinzenta tem formato de “borboleta” e a substância branca circunda a cinzenta (Tan; Faull; Curtis, 2023).

Histologicamente, a substância cinzenta, contém os corpos celulares dos neurônios e é organizada em diferentes colunas: ventral, dorsal e intermediária, que controlam diversas funções motoras e sensoriais, formando núcleos com funções específicas. Esses núcleos se estendem ao longo de toda a medula, conectando-se ao sistema periférico e controlando funções específicas como a inervação dos membros ou a coordenação de reflexos medulares. Dentro da substância cinzenta, neurônios se organizam em lâmina de Rexed, que são camadas funcionais associadas a diferentes tipos de sinalização nervosa, desde informações motoras até o controle de dor e temperatura (Bican; Minagar; Pruitt, 2013; Moore; Dalley; Agur, 2014; Schoeller *et al.*, 2016; Tan; Faull; Curtis, 2023).

A substância branca da medula espinhal é composta principalmente por fibras mielinizadas, conferindo, macroscopicamente, uma aparência esbranquiçada devido à mielina, uma camada rica em lipídios que isola os axônios. Durante a preparação histológica, os lipídios são dissolvidos por solventes como xilol e etanol, deixando espaços claros nos cortes histológicos (Moore; Dalley; Agur, 2014). A substância branca se organiza em funículos (dorsal, lateral e ventral) e conduz sinais, tanto ascendentes (sensorial) quanto descendentes (motor), entre o corpo e o cérebro (Sengul; Watson, 2015).

Além disso, tanto a substância branca quanto a cinzenta abrigam células gliais, como astrócitos, oligodendrócitos e micróglia, que desempenham funções essenciais de sustentação, proteção e regulação metabólica dos neurônios. Os astrócitos auxiliam na manutenção da barreira hematoencefálica e na homeostase local, enquanto os oligodendrócitos são responsáveis pela mielinização dos axônios na substância branca, facilitando a condução rápida dos impulsos nervosos. Por sua vez, a micróglia atua como o sistema imunológico residente da medula espinhal, sendo ativada em resposta a lesões ou inflamação (Köhler *et al.*, 2023; Köhler; Winkler; Hirrlinger, 2021).

A medula espinhal também desempenha funções vitais no controle motor e na regulação de funções autonômicas viscerais, processando informações sensoriais dos membros, tronco e órgãos internos, sendo fundamental na condução de impulsos aferentes e eferentes por meio dos tratos ascendentes e descendentes, permitindo a comunicação rápida entre o encéfalo e o resto do corpo (Moore; Dalley; Agur, 2014; Schoeller *et al.*, 2016). Essas informações ressaltam a complexidade da medula espinhal, em sua estrutura e atribuições, e enfatizam suas funções vitais. No entanto, essa complexa arquitetura funcional e histológica pode ser seriamente comprometida por lesões traumáticas. As LMs rompem a continuidade da substância branca e cinzenta, interrompendo os tratos de comunicação, levando à perda de funções motoras, sensoriais e autonômicas, dependendo da gravidade e da localização da lesão (Bican; Minagar; Pruitt, 2013; Orendáčová *et al.*, 2001; Tan; Faull; Curtis, 2023)

2.2 Lesão Medular

As LMs acompanham a história, com registros que remontam a 3000 a.C., no antigo Império Egípcio. Por séculos, o conhecimento sobre essas lesões e como tratá-las evoluiu de maneira lenta e limitada. Foi só no século XX, com o avanço da tecnologia e a necessidade urgente de cuidar dos muitos feridos nas guerras modernas, que foram iniciados estudos significativos na compreensão e no tratamento dessas lesões (Thakur *et al.*, 2020).

Como exposto anteriormente, a medula espinhal é um órgão altamente estruturado e intrincado, tanto anatômica quanto histologicamente, com papel fundamental na parte sensorial, controle motor e funções autonômicas. É crucial compreender sua estrutura e função em detalhes para diagnosticar e administrar lesões e enfermidades na medula espinhal. A estrutura complexa do SNC possibilita o controle diferenciado de diversas partes do corpo, com segmentos específicos da medula ligados a partes específicas do sistema nervoso periférico. O papel da medula espinhal é estudado devido ao impacto potencial de lesões medulares sobre o cotidiano das pessoas acometidas (World Health Organization, 2013).

De fato, lesões na medula espinhal causam a destruição parcial ou completa do tecido nervoso, levando à perda de funções sensoriais, motoras e autonômicas abaixo do local da lesão, que representa um dos maiores obstáculos na prática clínica médica atual. O progresso nas intervenções clínicas tem contribuído para aprimorar a qualidade de vida após traumas na medula espinhal, no entanto, a principal meta da ciência atualmente é descobrir um tratamento que possibilite a recuperação total (Yao *et al.*, 2022).

Em contraponto ao prognóstico restrito das transecções ou lesões anatomicamente completas, onde a barreira física da cicatriz glial e o núcleo necrótico impedem a reconexão, as lesões incompletas apresentam um microambiente biológico distinto, caracterizado pela presença de pontes de tecido neural preservado que sustentam uma recuperação funcional espontânea mais robusta. Nestes casos, a restauração de funções não depende necessariamente da regeneração axonal de longa distância por meio do epicentro da lesão, mas é impulsionada predominantemente pela plasticidade neuroanatômica e reorganização de circuitos nos tecidos remanescentes, incluindo o brotamento colateral de tratos

corticoespinhais e a formação de novos circuitos de relé por neurônios propriospinhais (Alizadeh; Dyck; Karimi-Abdolrezaee, 2019; O'Shea; Burda; Sofroniew, 2017).

Essa distinção fisiopatológica é fundamental, pois indica que, enquanto o tratamento de lesões completas exige a superação de barreiras inibitórias para criar conexões (*bridging*), as estratégias para lesões incompletas podem se beneficiar mais da potencialização dessa plasticidade sináptica endógena e da reativação de vias latentes já existentes (Ahuja *et al.*, 2017a; Hu *et al.*, 2023a).

Uma meta-análise abrangente da incidência global de lesão medular (LM) revelou 105 novos casos diagnosticados a cada milhão de habitantes, afetando desproporcionalmente países em desenvolvimento (Paiva *et al.*, 2023; Kumar *et al.*, 2018). Esta condição, comumente resultante de acidentes de trânsito e quedas de altura, representa um desafio significativo para os sistemas de saúde em todo o mundo.

Em contraste, a Europa demonstra incidência estimada de 16 novos casos por milhão, valor inferior à metade da incidência observada nos Estados Unidos (EUA), país no qual a LM impacta cerca de 38 indivíduos por milhão anualmente, totalizando aproximadamente 10.000 novos casos a cada ano. Dentre estes, a gravidade da lesão é evidente pela alta taxa de mortalidade: 4.000 vidas perdidas antes mesmo do atendimento hospitalar e outras 1.000 durante a internação (Paiva *et al.*, 2023).

A LM atinge principalmente jovens adultos, com maior prevalência na faixa etária de 20 a 24 anos. Este grupo etário vulnerável concentra 65% dos casos em indivíduos com menos de 35 anos, com marcante predominância masculina (80%). Nos EUA, os acidentes automobilísticos são responsáveis por metade dos casos, seguidos por quedas, que contribuem com 15% a 20% das ocorrências (Paiva *et al.*, 2023).

Aproximadamente 60% das lesões na coluna afetam, em sua maioria, homens entre 15 e 35 anos de idade, decorrentes principalmente de contusão consequente à acidentes automobilísticos (48%), seguidos por quedas (21%) e lesões relacionadas ao esporte (14,6%). Agressões e traumas por tiro são responsáveis por 10-20% dos casos (Mattucci *et al.*, 2019; Van den Hauwe; Flanders, 2024). As LMs acometem, principalmente, os segmentos, torácico (34,6%), cervical (32,3%) e lombar (23,8%) (Frydenberg; Steel, 2012).

As taxas de mortalidade hospitalar variam de 4% a 17%, e permanecem elevadas após a alta hospitalar, com 3,8% dos pacientes indo a óbito no primeiro ano

pós-lesão, 1,6% no segundo ano, e 1,2% para cada ano subsequente. A expectativa de vida para pacientes com lesões cervicais, por exemplo, é significativamente reduzida, com um indivíduo de 40 anos de idade vivendo, em média, mais 23 anos após a lesão cervical de nível 5 (C5-C8), 20 anos em nível C1-C4, e apenas 8,5 anos para pacientes que necessitam de ventilação mecânica (Ahuja *et al.*, 2017a; National Spinal Cord Injury Statistical Center, 2018).

A lesão medular (LM) interfere diretamente na condução de sinais sensoriais e motores devido aos danos nos axônios e nas sinapses nervosas, impactando as funções abaixo do nível da lesão. Isso pode resultar em paralisia, perda de sensibilidade e controle motor nas áreas afetadas. Além disso, as LMs afetam o sistema nervoso autônomo (SNA), prejudicando o controle de funções involuntárias como a pressão arterial, a frequência cardíaca, e a regulação de funções respiratórias e digestivas. Estudos destacam que a interrupção do SNA também está associada a complicações como disreflexia autonômica, hipotensão ortostática e alterações na regulação térmica, todas impactando significativamente a qualidade de vida e a saúde dos pacientes (Nas *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2014).

As consequências no sistema nervoso autônomo também complicam o tratamento e a reabilitação, uma vez que as funções comprometidas exigem intervenções clínicas multidisciplinares e monitoramento contínuo para evitar complicações adicionais e promover o nível de recuperação funcional (Jia *et al.*, 2013).

A análise histológica em modelos de lesão medular é uma ferramenta crítica para avaliar a extensão do dano tecidual e a eficácia de intervenções terapêuticas, focando na identificação de alterações morfológicas e na quantificação de estruturas preservadas. O procedimento padrão envolve a utilização de colorações como a Hematoxilina e Eosina (H&E), que permite a visualização da arquitetura geral do tecido, identificando áreas de necrose, hemorragia, edema e a presença de infiltrado inflamatório nas substâncias branca e cinzenta. Complementarmente, o uso do Luxol Fast Blue (LFB) é essencial para avaliar a integridade da substância branca, corando as bainhas de mielina e permitindo a distinção entre áreas desmielinizadas e tratos axonais preservados. Além da avaliação qualitativa, é imperativo realizar análises quantitativas ou morfométricas, frequentemente com o auxílio de softwares como o ImageJ, para mensurar a área de cavitação cística (degeneração tecidual) em relação à área total da medula, bem como realizar a contagem de neurônios sobreviventes e

células gliais (Correia *et al.*, 2025a; 2025b; Montine; Dintzis; Treuting, 2018; Paula *et al.*, 2014; Veronez *et al.*, 2017).

O exame de Padrões Internacionais para a Classificação Neurológica das LMs (ISNCSCI), desenvolvido pela American Spinal Injury Association (ASIA), constitui uma ferramenta essencial para a avaliação das funções motoras e sensoriais em pacientes com LM (Eckert; Martin, 2017). Sua aplicação permite determinar precisamente o nível e a gravidade da lesão, auxiliando a equipe de saúde no estabelecimento de um plano terapêutico adequado e no direcionamento do prognóstico.

No Brasil, as estimativas epidemiológicas indicam incidência de, aproximadamente, 40 novos casos de LM por milhão de habitantes anualmente, resultando em cerca de 8.000 novos casos a cada ano. Cerca de 130 mil pessoas morrem anualmente por trauma, e cerca de 450 mil apresentam sequelas graves, com trânsito e violência urbana como as principais causas (Brasil, 2015). A prevalência quanto ao sexo indica que 82,9% dos acometidos pertencem ao sexo masculino, e a média de idade destes foi de 26,5 anos. Além disso, aproximadamente 60% das vítimas de LME possuem de 10 a 30 anos, indicando que as lesões afetam predominantemente homens jovens (Paiva *et al.*, 2023).

Os custos associados ao tratamento de indivíduos com LM, incluindo as mais diversas despesas como cuidados domiciliares (como adaptações na residência, contratação de cuidadores e aquisição de equipamentos), serviços médicos (internações, cirurgias, consultas, exames e medicamentos) e o tratamento de complicações secundárias (infecções, úlceras de pressão, dores crônicas, entre outras), pode chegar a US\$ 200.000,00 nos primeiros dois anos (Paiva *et al.*, 2023). Após a LM, os custos de reabilitação e assistência de longo prazo podem ser elevados. Relatórios do Ministério da Previdência Social mostraram que, em 2005, foram gastos cerca de R\$ 1,14 bilhões em aposentadorias por invalidez (Castro *et al.*, 2008). Atualmente, de acordo com a Fundação Instituto de Pesquisas Econômicas (FIPE) as aposentadorias por invalidez cresceram para aproximadamente R\$ 81 bilhões (Costanzi, 2023).

Para além dos custos diretos em relação a saúde, as consequências da lesão medular acarretam severas consequências socioeconômicas, devido a morbididade, pois pode haver perda de produtividade, devido à incapacidade de trabalho, e aos

altos custos de reabilitação, que se estendem ao longo de toda a vida do paciente (Paiva *et al.*, 2023; Venkatesh *et al.*, 2019).

O tempo crítico entre a ocorrência da lesão, o transporte do indivíduo ao hospital e o início do tratamento por uma equipe especializada pode determinar diferentes desfechos no quadro clínico (Brasil, 2015). A precocidade da estabilização do quadro e a oferta de cuidados intensivos nas primeiras horas após a lesão são decisivas para minimizar complicações e melhorar o prognóstico do paciente (Al-Habib *et al.*, 2021; Kessler *et al.*, 2018).

Estudos recentes destacam que os custos indiretos, como perda de produtividade e o impacto econômico familiar, também são significativos e variam de acordo com a severidade da lesão e o acesso a serviços de reabilitação (Rastogi *et al.*, 2021).

2.2.1 Fisiopatologia: Fases da Lesão Primária e Secundária

A lesão medular envolve uma sequência temporal organizada de eventos fisiopatológicos iniciados no momento do trauma. A fase primária corresponde ao dano mecânico imediato, caracterizado por ruptura axonal, lesão vascular e hemorragia local. Esse insulto inicial desencadeia a fase secundária, que se desenvolve nas horas e dias subsequentes e é responsável pela amplificação do dano tecidual.

Na fase aguda, ocorre edema, desequilíbrio iônico e liberação excessiva de glutamato, levando à excitotoxicidade, disfunção mitocondrial e morte celular por necrose e apoptose (Ahuja *et al.*, 2017b). Paralelamente, há comprometimento da barreira hematoespinal, favorecendo a infiltração de células inflamatórias.

Na transição para a fase subaguda ou intermediária (7 a 14 dias), o microambiente lesionado passa a ser dominado pela resposta inflamatória. Neutrófilos presentes nas fases iniciais são progressivamente substituídos por macrófagos, provenientes da circulação, e micróglia ativada, responsáveis pela fagocitose de restos celulares, mas também pela liberação de citocinas pró-inflamatórias, que podem perpetuar o dano secundário (Anjum *et al.*, 2020; Fleming *et al.*, 2006).

Simultaneamente, instala-se a astrogliose reativa, caracterizada pela proliferação e hipertrofia de astrócitos, que formam a cicatriz glial. Embora essa estrutura atue como mecanismo de contenção da inflamação e estabilização do

tecido, ela também representa uma barreira à regeneração axonal. Na fase crônica, a persistência desses processos resulta na formação de cavidades císticas e perda tecidual permanente (O'Shea; Burda; Sofroniew, 2017; Tran; Warren; Silver, 2018).

2.3 Tratamentos Atuais e Manejo Clínico da Lesão Medular

O manejo clínico da lesão medular (LM) permanece, em grande parte, focado na mitigação dos danos secundários e na estabilização sistêmica, uma vez que a regeneração do tecido nervoso central perdido ainda constitui um desafio biológico não superado na prática clínica atual. A abordagem inicial é crítica e segue protocolos rigorosos de suporte avançado de vida (ATLS), priorizando a manutenção das vias aéreas e a estabilidade hemodinâmica para prevenir a hipóxia e a hipotensão, fatores que sabidamente exacerbam a isquemia medular e a extensão da necrose tecidual (Ahuja *et al.*, 2017b; Feitosa, 2011; Kessler *et al.*, 2018). O transporte deve ser realizado com imobilização estrita da coluna vertebral para evitar lesões mecânicas adicionais às estruturas neurais já comprometidas, sendo o paciente encaminhado, preferencialmente, a centros especializados em trauma raquimedular, onde a intervenção precoce pode impactar positivamente o prognóstico funcional a longo prazo (Karsy; Hawryluk, 2019).

2.3.1 Descompressão Cirúrgica e Estabilização

A intervenção cirúrgica para descompressão e estabilização da coluna vertebral é o pilar central do tratamento agudo. O conceito de "Tempo é Medula" (*Time is Spine*) foi corroborado por evidências recentes, incluindo estudos como o STASCIS (Fehlings *et al.*, 2012) e meta-análises subsequentes, demonstrando que a descompressão cirúrgica precoce, definida classicamente como aquela realizada dentro de 24 horas após o trauma, está associada a uma recuperação neurológica superior e menores complicações sistêmicas (Eli; Lerner; Ghogawala, 2021; Karsy; Hawryluk, 2019; Lima *et al.*, 2022). Diretrizes recentes da recomendaram fortemente a cirurgia precoce como opção terapêutica padrão, independentemente do nível da lesão (Hubertus *et al.*, 2025). Mais recentemente, discutiu-se o benefício da cirurgia "ultra precoce" (realizada dentro de 8 a 12 horas), embora as evidências para este intervalo específico

ainda exijam maior validação em ensaios clínicos robustos (Montoto-Marqués *et al.*, 2025).

2.3.2 Manejo Hemodinâmico e a Controvérsia dos Corticoides

Após a estabilização cirúrgica, o foco na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) é a manutenção da perfusão medular para evitar a isquemia secundária. As diretrizes atuais da *American Association of Neurological Surgeons* (AANS) e do *Congress of Neurological Surgeons* (CNS) recomendaram a manutenção da pressão arterial média (PAM) entre 85 e 90 mmHg por 5 a 7 dias pós-lesão, utilizando vasopressores como a norepinefrina, para combater o choque neurogênico e a hipotensão sistêmica (Ahuja *et al.*, 2017a; Karsy; Hawryluk, 2019; Montoto-Marqués *et al.*, 2025).

No âmbito farmacológico, o uso de altas doses de metilprednisolona (MP) apresentou declínio significativo na aceitação global. Historicamente, os estudos *National Acute Spinal Cord Injury Study* (NASCIS II e III), publicados na década de 1990, sugeriram que a administração de MP nas primeiras 8 horas após a lesão poderia oferecer benefícios motores modestos. Revisões sistemáticas recentes e diretrizes clínicas apontaram que os riscos de graves eventos adversos, como hemorragia gastrointestinal, infecções de ferida e pneumonia, frequentemente superam os modestos benefícios neurológicos (Ahuja *et al.*, 2017a; Fan; Wei; Feng, 2022; Montoto-Marqués *et al.*, 2025). Atualmente, a MP não é considerada um padrão de cuidado obrigatório, mas sim uma opção terapêutica que deve ser criteriosamente ponderada pelo clínico, sendo contraindicada em muitos protocolos modernos (Fan; Wei; Feng, 2022; Montoto-Marqués *et al.*, 2025; Hu, 2023a).

2.4 Avanços e Novas Perspectivas Terapêuticas: Da Neuroproteção à Regeneração

Diante das limitações das terapias convencionais, que falham em promover a regeneração axonal robusta, a pesquisa translacional tem focado em estratégias multifatoriais. A fisiopatologia da LM envolve uma complexa cascata de eventos secundários, incluindo excitotoxicidade, estresse oxidativo, inflamação exacerbada e formação de cicatrizes gliais e fibróticas, que criam um microambiente inibitório ao

crescimento neural. Portanto, as novas abordagens buscam não apenas proteger o tecido remanescente, mas também modular esse ambiente hostil para favorecer a plasticidade e a regeneração.

2.4.1 Neuroproteção Farmacológica Avançada

Diversos agentes neuroprotetores têm avançado para ensaios clínicos com o objetivo de interromper a cascata de lesão secundária. O Riluzol, um bloqueador dos canais de sódio, atua prevenindo o influxo excessivo de sódio e cálcio intracelular e reduzindo a liberação pré-sináptica de glutamato, mitigando assim a excitotoxicidade e o edema celular que levam à morte neuronal (Fan; Wei; Feng, 2022; Karsy; Hawryluk, 2019; Venkatesh *et al.*, 2019). Outro agente promissor é a Minociclina, um antibiótico derivado da tetraciclina que possui potentes propriedades anti-inflamatórias e antiapoptóticas, inibindo a ativação da micróglia, reduzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias (como TNF- e IL-1) e protegendo oligodendrócitos da morte celular, com preservação dos tratos axonais (Ahuja *et al.*, 2017a; 2017b). Além disso, inibidores da via Rho-ROCK, como o Cethrin (VX-210), têm sido investigados para bloquear as vias de sinalização intracelular que causam o colapso do cone de crescimento axonal, facilitando a regeneração em ambiente inibitório geral (Ahuja *et al.*, 2017b; Fan; Wei; Feng, 2022).

2.4.2 Engenharia de Tecidos e o Potencial da Membrana Amniótica

A falha na regeneração das estruturas que compõem o SNC é atribuída, em grande parte, à barreira física e química imposta pela cicatriz glial e pelas cavidades císticas. Para superar isso, a Membrana Amniótica (MA) desponta como um biomaterial natural capaz de atuar como *scaffold* (arcabouço) de excelência, devido às suas propriedades biológicas intrínsecas e à baixa imunogenicidade. A MA contém uma matriz extracelular rica em colágeno, laminina e fibronectina, que fornece suporte estrutural para a adesão e migração celular, além de células epiteliais e mesenquimais que secretam um conjunto de fatores bioativos, incluindo fatores neurotróficos (NGF, BDNF), anti-inflamatórios (IL-10, inibidores de MMPs) e antifibróticos. Estudos recentes demonstraram que a aplicação da MA pode modular o fenótipo de macrófagos e micróglia, favorecendo a transição do estado pró-inflamatório (M1) para

o fenótipo reparador (M2), reduzindo a fibrose e promovendo a neuroproteção e a regeneração axonal no local da lesão (Arisawa, 2017; Correia *et al.*, 2025b; Neves *et al.*, 2018).

2.4.3 Fotobiomodulação (FBM): Mecanismos Biofísicos e Celulares

A Fotobiomodulação (FBM) consolidou-se como uma estratégia terapêutica não invasiva capaz de modular processos celulares por meio da absorção de energia luminosa por cromóforos endógenos. O mecanismo primário baseia-se na absorção de fótons dos espectros vermelho e infravermelho próximo pela enzima citocromo c oxidase (CCO), situada na membrana mitocondrial interna. Essa interação fotofísica induz a liberação do óxido nítrico que estava ligado à enzima, desativando o bloqueio competitivo e restabelecendo o fluxo de elétrons na cadeia respiratória (Hamblin, 2017; Hamblin; Liebert, 2022). Esse evento fotofísico resulta não apenas na elevação da síntese de ATP e do potencial de membrana, mas também na geração transitória de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS). Em níveis fisiológicos, esses ROS atuam como segundos mensageiros essenciais, ativando fatores de transcrição nuclear, como NF- κ B em células normais, que regulam a expressão de genes de sobrevivência e proliferação (Hamblin, 2017). Adicionalmente, em teoria, a FBM pode modular canais iônicos sensíveis à luz e ao calor, como os da família TRP (Transient Receptor Potential), alterando a homeostase do cálcio intracelular e amplificando a cascata de sinalização (Dompe *et al.*, 2020).

O aumento da disponibilidade energética sustenta a manutenção das funções celulares em tecidos viáveis e atua na regulação da dinâmica mitocondrial, prevenindo o desequilíbrio de fissão mitocondrial observado na fase subaguda da lesão (Li *et al.*, 2023). Paralelamente, a FBM exerce papel modulador sobre a resposta inflamatória, reduzindo a expressão de mediadores pró-inflamatórios, como TNF-, IL-1 e iNOS (Marcos *et al.*, 2025; Tobelem *et al.*, 2022). Evidências indicam ainda que a terapia favorece a transição de macrófagos do fenótipo inflamatório M1 para o perfil reparador M2 pela ativação da via de sinalização PKA-CREB, o que estimula a secreção de fatores neurotróficos, como BDNF e NGF (Zhang *et al.*, 2020). Essa repolarização contribui decisivamente para a redução do recrutamento e da manutenção de células inflamatórias no local da lesão (Song *et al.*, 2017; Tobelem *et al.*, 2022).

A atenuação da cascata inflamatória secundária limita a expansão do dano tecidual, reduz a necrose e a formação de cavitações, e preserva estruturas neurais adjacentes. Ao transformar um microambiente inicialmente hostil em um ambiente mais permissivo, a FBM favorece a sobrevivência celular, a reorganização tecidual e a recuperação funcional. Em modelos experimentais de lesão medular, esses efeitos têm sido associados à preservação axonal, à redução da cavitação e à melhora do desempenho motor (Correia *et al.*, 2025a).

2.4.4 Estratégias Combinatórias

Dada a complexidade multifatorial da patofisiologia da LM, o consenso científico atual aponta que uma única modalidade terapêutica dificilmente será suficiente para promover a cura completa (Fan; Wei; Feng, 2022; Yao *et al.*, 2022). A tendência mais promissora reside nas terapias combinatórias, que integram o suporte estrutural e trófico de biomateriais (como a MA) com a modulação metabólica e anti-inflamatória de terapias biofísicas (como a FBM). A associação dessas terapias pode criar um efeito sinérgico: enquanto a MA protege a área da lesão, proporcionando um ambiente favorável ao crescimento celular, a FBM estimula a atividade mitocondrial e a produção de ATP das células sobreviventes e modula a resposta imune aguda, potencializando a preservação tecidual e a recuperação funcional motora e sensitiva (Campos *et al.*, 2025; Correia *et al.*, 2025a; Nicodemo *et al.*, 2024).

2.5 Modelos animais em lesões medulares

Modelos experimentais de LM em ratos são amplamente empregados na pesquisa para investigar mecanismos de dano e de regeneração, além de avaliar terapias em potencial. Esses modelos reproduzem características-chave da patologia humana, possibilitando análises funcionais e histológicas detalhadas e contribuindo para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas inovadoras (Alizadeh; Dyck; Karimi-Abdolrezaee, 2019). Além dos roedores, modelos em animais de maior porte, como suínos e primatas não humanos, bem como em outros vertebrados, também são utilizados (Figura 2), especialmente em etapas translacionais mais avançadas,

por apresentarem maior similaridade anatômica e biomecânica com a medula espinhal humana.

Figura 2- Principais modelos experimentais de lesão medular (LM) descritos na literatura, distribuídos por espécie animal.

Classe	Ordem / Espécie	Tipo de Lesão Medular	Tempo para Recuperação (Locomoção ou Natação)
Mamíferos	Primatas (<i>Macaco rhesus</i>)	Compressão, Contusão, Transecção (Completa ou Parcial)	Várias semanas a meses. Obs: Não ocorre em transecção completa ou compressão grave.
	Artiodáctilo (Ovelha, Porco, Miniporco)	Contusão	Várias semanas a meses.
	Predadores (Gato)	Transecção completa ou parcial (Funículo dorsal, coluna ventral)	
	Predadores (Cão)	Compressão, Transecção parcial	
	Lagomorfa (Coelho)	Compressão, Contusão, Distração	Várias semanas a meses. Obs: Não ocorre em transecção completa ou compressão grave.
	Roedores (Rato - <i>Rattus norvegicus</i>)	Compressão, Contusão, Transecção (Completa, Parcial, Hemissecção, Lesões ventrais)	
	Roedores (Camundongo - <i>Mus musculus</i>)	Compressão, Contusão, Transecção (Completa ou parcial)	Várias semanas a meses.
Anfíbios	Salamandra / Rã-de-unhas-africana	Amputação da cauda ou Transecção completa	Salamandra: 2-3 meses / Rã: 20-30 dias
Lampréias	Lampréia-marinha	Transecção completa (níveis rostrais)	2-3 meses
Peixes	Peixe-dourado, Zebrafish, Guppie, Enguia	Transecção completa	1-2 meses
Peixes	Peixe-faca-fantasma	Amputação caudal	1-2 meses

Fonte: Adaptado (Sobolev *et al.*, 2025)

Entre os modelos mais utilizados estão os de contusão e compressão, que se destacam por simularem de maneira bastante realista os traumas medulares em humanos. Na contusão, a lesão é provocada por um impacto controlado, enquanto a compressão envolve o uso de dispositivos que exercem pressão contínua sobre a medula (Lilley *et al.*, 2020). Ambos resultam em cavidades císticas e comprometimentos motores semelhantes aos observados clinicamente. Já o modelo de transecção, que consiste no corte parcial ou completo da medula, embora menos representativo do trauma humano, é de grande valor para estudos sobre regeneração axonal e reorganização neural. Além desses, modelos mais recentes têm buscado reproduzir lesões crônicas e não traumáticas, ampliando as possibilidades de investigação e aproximando-se de outras condições clínicas relevantes (Alizadeh; Dyck; Karimi-Abdolrezaee, 2019; Fan; Wei; Feng, 2022).

A avaliação da recuperação funcional nos ratos é feita principalmente por meio de testes comportamentais, sendo o BBB (Basso, Beattie, Bresnahan) o método mais

utilizado para mensurar a locomoção, no entanto, por se tratar de um método fundamentado na observação visual contínua, sua principal limitação é a inerente subjetividade, o que introduz um potencial viés do observador na interpretação dos escores (Khan; Ahmed, 2022). Outros protocolos complementares analisam a coordenação motora e funções autonômicas, como o controle da bexiga e do intestino. Em paralelo, estudos histológicos e moleculares permitem explorar em profundidade fenômenos como a inflamação, a morte celular, a neuroplasticidade e a formação da cicatriz glial, que juntos definem a progressão e os limites da regeneração tecidual.

2.6 Fotobiomodulação

A capacidade de estimular diferentes tipos celulares, favorecendo a cicatrização de feridas e a proliferação celular, levou ao desenvolvimento de uma nova abordagem terapêutica, inicialmente denominada terapia a laser de baixa intensidade (LLLT) e atualmente conhecida como fotobiomodulação (Hamblin, 2018).

A FBM é um processo não invasivo e não térmico que ativa cromóforos endógenos em diferentes níveis biológicos, induzindo eventos fotofísicos e fotoquímicos em tecidos lesionados, e consiste no uso de fótons para modular processos celulares e biológicos. Essa técnica baseia-se na aplicação controlada e progressiva da luz, capaz de estimular respostas terapêuticas nos tecidos-alvo (Hernández-Bule *et al.*, 2024), produzindo efeitos que incluem alívio da dor, redução da inflamação, imunomodulação, promoção da cicatrização de feridas e regeneração tecidual (Dompe *et al.*, 2020; Hernández-Bule *et al.*, 2024).

Clinicamente, a FBM tem sido aplicada com diversos protocolos de tratamento para condições como lesões do músculo esquelético, artrite reumatoide e controle da dor (Santos *et al.*, 2017; Glass, 2021; Ramos *et al.*, 2012; 2018). Além disso, a PBM tem sido investigada para distúrbios neurológicos e neurodegenerativos, incluindo traumatismo cranioencefálico, esclerose múltipla, Alzheimer e doença de Parkinson (Hamblin, 2016; Naeser; Hamblin, 2015; Yang *et al.*, 2022). Em modelos de LM, pesquisadores exploraram a terapia a laser transcutânea com distintos parâmetros de irradiação e duração de tratamento para avaliar sua eficácia. A fototerapia, na faixa de 600-900 nm, demonstrou a capacidade de estimular processos metabólicos celulares, fenômeno que tem sido aplicado na área médica (Drozdov *et al.*, 2014;

Zhang et al. 2018; 2020). Dentre as abordagens terapêuticas investigadas, a FBM se destaca como técnica não invasiva que fornece energia às células viáveis, favorecendo os processos de regeneração tecidual. Evidências crescentes sugerem que a FBM apresenta efeitos benéficos no contexto da medicina regenerativa, promovendo a recuperação de tecidos danificados em diferentes modelos experimentais.

O mecanismo fundamental por trás desses benefícios reside na interação da FBM com a bioenergética mitocondrial, especificamente por meio da enzima citocromo c oxidase, o complexo IV da cadeia de transporte de elétrons. Em tecidos sob estresse ou hipóxia, condições onipresentes na lesão medular, o óxido nítrico liga-se à enzima, deslocando o oxigênio e inibindo a respiração celular (Hamblin, 2016, 2017; Hamblin; Liebert, 2022; Liebert *et al.*, 2023). A absorção de fótons promove a fotodissociação do óxido nítrico, restaurando o potencial de membrana mitocondrial e o consumo de oxigênio (Chang; Lee, 2023; Hamblin, 2017, 2018; Mosca *et al.*, 2019). Esta reativação metabólica dispara uma sinalização retrógrada da mitocôndria para o núcleo, ativando fatores de transcrição que regulam positivamente genes associados à sobrevivência celular, proliferação e secreção de fatores neurotróficos essenciais para a neuroregeneração (Liebert *et al.*, 2023).

Dessa forma, o aumento na produção de adenosina trifosfato induzido pela FBM não deve ser compreendido apenas como um aporte de energia imediata, mas como o fornecimento de substrato crítico para os processos anabólicos de reparo. O ATP gerado serve como doador de fosfatos e como nucleotídeo precursor para a síntese de ácidos nucleicos, fundamentais para a intensa divisão celular e síntese proteica que caracterizam a fase regenerativa (Hamblin, 2018; Mosca *et al.*, 2019). Além disso, o ATP atua na sinalização purinérgica extracelular, modulando a resposta de células gliais e imunes. No tecido nervoso, essa disponibilidade energética é crucial para a polimerização de microtúbulos, um processo dependente de ATP que sustenta o transporte axonal e evita a falência metabólica que levaria à morte celular secundária (Anjum *et al.*, 2020; Chang; Lee, 2023; Freitas; Hamblin, 2016; Liebert *et al.*, 2023).

Para além da modulação do processo inflamatório e do suporte metabólico, a FBM exerce efeitos diretos nos mecanismos de reparo tecidual, dor e sensibilidade. No contexto do reparo, a terapia estimula a proliferação de fibroblastos e a síntese de colágeno, fundamentais para a integridade da matriz extracelular em diversos tecidos (Santos *et al.*, 2021; Glass, 2021; Liebert *et al.*, 2023).

No controle da dor, as evidências sugerem que a irradiação pode induzir varicosidades transitórias nos neurônios, promovendo uma interrupção temporária do fluxo axonal e um bloqueio reversível da transmissão nervosa, assemelhando-se ao efeito de anestésicos farmacológicos. Adicionalmente, a FBM modula canais iônicos de potencial receptor transitório, que regulam a entrada de cálcio e a sinalização nociceptiva, oferecendo uma via para o tratamento da sensibilização central (Hamblin, 2018; Liebert *et al.*, 2023; Zhang *et al.*, 2024). Em modelos de lesão medular, o uso de parâmetros específicos de fluência tem demonstrado eficácia na melhora da sensibilidade tátil, sugerindo que a FBM pode preservar ou recuperar tratos sensoriais específicos pela estabilização do citoesqueleto e da proteção axonal (Veronez *et al.*, 2017).

Revisão sistemática recente, conduzida por Tobelem *et al.* (2022), avaliou o impacto da Fotobiomodulação (FBM) em modelos experimentais de lesão medular, reunindo 19 estudos publicados entre 2009 e 2021. A análise demonstrou que a terapia com laser de baixa intensidade, predominantemente no espectro infravermelho, utilizado em 68,4% dos estudos, está associada à melhora da preservação tecidual e da recuperação funcional. Entre os mecanismos biológicos descritos destacaram-se a redução de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-1 β , a inibição da ativação de astrócitos neurotóxicos do tipo A1 e a modulação da polarização de macrófagos do fenótipo inflamatório M1 para o perfil reparador M2.

Apesar da heterogeneidade nos parâmetros dosimétricos, com potências variando de 25 a 200 mW e janelas terapêuticas entre 5 e 21 dias, os autores ressaltaram que a intervenção precoce, iniciada nas primeiras horas após o trauma, especialmente entre 30 minutos e 2 horas, parece ser determinante para a atenuação da cascata inflamatória secundária e para o favorecimento do crescimento axonal. Esses achados reforçam o papel da FBM como estratégia promissora na modulação do microambiente inflamatório pós-lesão e na limitação da progressão do dano secundário em modelos experimentais de lesão medular.

2.7 Membrana Amniótica

A membrana amniótica (MA) é um derivado perinatal obtido da camada mais interna da placenta humana, composta por um arcabouço estrutural, células e fatores secretados. Sua organização está estruturada em duas principais camadas: uma

camada epitelial, formada por células que recobrem a superfície e participam da secreção de moléculas bioativas, e uma camada mesenquimal, rica em matriz extracelular. É um tecido biocompatível imuno privilegiado com ação anti-inflamatória, antifibrótica, antimicrobiana, antimutagênica (Fénelon *et al.*, 2021) facilitador da angiogênese e atuante na remissão do estresse oxidativo (Hu *et al.*, 2023b). Quando aplicada em lesões, adere ao leito da ferida, mantendo um microambiente úmido e promovendo cicatrização, enquanto se integra e é progressivamente absorvida pelo organismo (Sarvari *et al.*, 2022). A MA é fonte de mais de 226 fatores de crescimento e citocinas (Maljaars *et al.*, 2022), combinada com propriedades mecânicas que incluem permeabilidade, estabilidade, elasticidade, flexibilidade e reabsorção. Apresenta, ainda, capacidade de adesão celular, graças aos seus componentes estruturais naturais da matriz extracelular, como ácido hialurônico, colágenos, laminina, fibronectina e proteoglicanos, constituindo um biomaterial “pronto para uso” (Fénelon *et al.*, 2021).

Nos últimos anos, avanços na pesquisa translacional têm ampliado significativamente o potencial da MA. Além de seu uso consolidado em oftalmologia e na cicatrização de feridas, estudos recentes destacam aplicações em ortopedia, odontologia e neurociências, incluindo modelos experimentais de regeneração óssea, cartilaginosa e nervosa (Alves; Sant’Anna, 2016; Elkhenany *et al.*, 2022; Etchebarne *et al.*, 2021; Meller *et al.*, 2011; Walkden, 2020). A presença de células-tronco amnióticas, com propriedades pluripotentes e baixo risco imunológico, reforça seu valor como fonte alternativa para terapias celulares. Paralelamente, abordagens em engenharia tecidual vêm explorando a descelularização e recelularização da MA para obtenção de “scaffolds” personalizados, assim como sua modificação com nanopartículas e polímeros para potencializar resistência, tempo de degradação e propriedades antimicrobianas (Arrizabalaga; Nollert, 2018). Outra vertente promissora envolve seu uso como plataforma de liberação controlada de biomoléculas, aproveitando sua matriz bioativa para veiculação de fatores regenerativos (Elkhenany *et al.*, 2022). Por fim, avanços em criopreservação, liofilização e esterilização têm otimizado seu armazenamento e disponibilidade clínica, consolidando a MA como um biomaterial versátil e promissor na medicina regenerativa (Ingraldi; Audet; Tabor, 2023; Milyudin *et al.*, 2023; Munoz-Torres *et al.*, 2023).

2.8 Análise de movimento - Força de Reação do Solo

A Força de Reação do Solo (FRS) é a força exercida pelo solo contra o corpo no momento do contato, obedecendo à Terceira Lei de Newton (“para toda ação há uma reação de igual intensidade e em sentido oposto”). Em análises biomecânicas, como na marcha ou corrida, a FRS é registrada ao longo do tempo para identificar padrões de aplicação de força, desempenho motor e possíveis alterações decorrentes de lesões ou intervenções (Beloni *et al.*, 2025a; 2025b; Yu *et al.*, 2021).

A força de reação do solo (FRS) é um parâmetro central na análise biomecânica da marcha e da corrida, pois reflete a interação entre o corpo e o ambiente durante o movimento. Essa força pode ser decomposta em três direções principais: vertical, anteroposterior e médio-lateral (Lichtwark *et al.*, 2024). O componente vertical é o mais estudado e apresenta, de forma característica, dois picos distintos ao longo do ciclo de apoio. O primeiro ocorre logo após o contato inicial do pé com o solo, quando há absorção do impacto e transferência do peso corporal; o segundo pico surge no final do apoio, representando a fase de propulsão, em que o pé impulsiona o corpo para o próximo passo. No eixo anteroposterior, observa-se um pico de frenagem, associado à desaceleração inicial, e um pico de propulsão subsequente. Já o componente médio-lateral tende a apresentar maior variabilidade entre indivíduos, sendo influenciado por fatores como posicionamento do pé, tipo de calçado e características da superfície de contato (Ancillao *et al.*, 2018).

Dessa forma, a análise da FRS fornece informações essenciais sobre o padrão de movimento, eficiência locomotora e possíveis alterações relacionadas a sobrecargas ou instabilidades. A análise da FRS possibilita a identificação de alterações no padrão de marcha, sendo uma ferramenta valiosa na avaliação biomecânica e em contextos clínicos para monitoramento e reabilitação (Yu *et al.*, 2021). Tradicionalmente, a medição da FRS é realizada em ambientes controlados utilizando plataformas de força ou esteiras instrumentadas. Contudo, avanços tecnológicos possibilitam, atualmente, a estimativa dessa força por meio de sensores vestíveis, como unidades de medição inercial (IMUs), que permitem a avaliação em ambientes mais naturais e fora do laboratório, ampliando as possibilidades de monitoramento em campo e em contextos clínicos (Ancillao *et al.*, 2018).

A análise biomecânica da marcha em modelos experimentais pode ser realizada por meio de plataformas específicas que permitem mensurar parâmetros como velocidade média e FRS (Beloni *et al.*, 2025a; 2025b). No caso de pesquisas utilizando animais, A FRS corresponderá à força exercida pelo solo em resposta ao deslocamento do animal, refletindo o desempenho funcional da marcha e a capacidade de sustentação de peso. Os dados geralmente são obtidos pela distribuição média da força (em Newtons) ao longo do tempo de deslocamento (em segundos), possibilitando a avaliação comparativa entre diferentes grupos experimentais (Beloni *et al.*, 2025a; Neves *et al.*, 2018).

3 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

A recuperação de indivíduos com LM, em grande parte decorrentes de acidentes automobilísticos e quedas, representa um desafio significativo para a saúde pública, não apenas pelos impactos funcionais e sociais, mas também pela necessidade de cuidados contínuos, que afetam tanto os pacientes quanto seus familiares (Paiva *et al.*, 2023). Muitas das intervenções terapêuticas são realizadas em centros especializados, demandando longos períodos de acompanhamento e gerando custos elevados para o sistema de saúde (Venkatesh *et al.*, 2019).

As LMs representam um desafio crescente para a saúde pública, considerando o crescente aumento no número de casos, evidenciando que se trata de um problema que ultrapassa o controle individual e reforçando a necessidade de avanços nas estratégias terapêuticas para os pacientes acometidos (Yao *et al.*, 2022).

Nesse cenário, a busca por tratamentos mais eficazes é contínua (Khan; Ahmed, 2022). A FBM tem sido extensivamente estudada, apresentando ampla variedade de aplicações, especialmente na regeneração tecidual. No entanto, a diversidade de protocolos utilizados dificulta a comparação entre os estudos existentes (Glass, 2021; Liebert *et al.*, 2023). A MA por sua vez, vêm se destacando com abordagens promissoras devido às suas propriedades anti-inflamatórias, imunomoduladoras e antifibróticas, além da liberação de fatores de crescimento (Fénelon *et al.*, 2021; Milyudin *et al.*, 2023).

Dada essa relevância, torna-se essencial ampliar o conhecimento sobre a eficácia dessas terapias, individualmente ou associadas, utilizando modelos experimentais de LM. Avanços nessa área podem resultar em protocolos otimizados, com potencial para reduzir o tempo de tratamento, melhorar o prognóstico funcional, diminuir os custos assistenciais e aumentar as taxas de sucesso clínico.

4 HIPÓTESES

-Hipótese nula (H0): LMs tratadas com FBM e/ou MA, isoladamente ou em associação, não apresentarão nenhum resultado positivo nos grupos tratados quando comparados ao grupo lesionado sem tratamento.

-Hipótese alternativa (H1): A aplicação da Fotobiomodulação (FBM) e/ou da Membrana Amniótica (MA), isoladas ou em associação, promove:

1. Microscopicamente: Redução estatisticamente significativa da área percentual de cavitação cística e maior preservação da arquitetura tecidual no epicentro da lesão, mensuradas por análise morfométrica quantitativa;

2. Funcionalmente: Recuperação superior dos parâmetros biomecânicos da marcha, evidenciada pela restauração do padrão da curva de Força de Reação do Solo (FRS), aproximando-se do grupo controle, quando comparados ao grupo lesionado não tratado.

5 OBJETIVO

5.1 Objetivo Geral

Avaliar e comparar o potencial terapêutico da membrana amniótica e da fotobiomodulação, isoladas ou em associação, no tratamento de lesões medulares induzidas em modelo animal, por meio de análises histológicas e de movimento nos períodos experimentais de 7 e 14 dias.

5.2 Objetivos específicos

- Avaliar histologicamente, de forma qualitativa e quantitativa, a área de cavitação e a preservação da arquitetura tecidual da medula espinhal, nos períodos experimentais de 7 e 14 dias, nos diferentes grupos experimentais.
- Analisar a recuperação funcional locomotora dos animais submetidos aos diferentes protocolos terapêuticos, por meio da mensuração da força de reação do solo (FRS), nos diferentes tempos experimentais (7 e 14), nos momentos 0, 3 e 7 e 7 e 14 dias pós-lesão.
- Comparar os efeitos terapêuticos da fotobiomodulação, da membrana amniótica e de sua combinação sobre os parâmetros biomecânicos e histológicos avaliados, considerando os diferentes tempos experimentais.
- Identificar o protocolo terapêutico com maior potencial neuroprotetor e funcional, a partir da integração entre os achados histológicos e biomecânicos.

6 MATERIAL E MÉTODOS

6.1 Desenho Experimental

Estudo longitudinal, randomizado manualmente, controlado, que comparou a ação da FBM e da MA no tratamento de LM, isoladamente ou em associação.

6.2 Aspectos Éticos do Estudo

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) sob o protocolo CAAE: 58916222.0.0000.5503, com parecer de aprovação 5.495.002 (ANEXO A) para colheita da membrana amniótica humana. Os dados pessoais das participantes foram armazenados de forma segura e sigilosa de acordo com a Lei Geral de Proteção de Dados Pessoais, Lei nº 13.709/2018.

O projeto de pesquisa foi, também, aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais, sob parecer A8-CEA-2022 (ANEXO B). O estudo foi conduzido seguindo as resoluções nº 466/2012 e nº 510/2016 do Conselho Nacional de Saúde (CNS), Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e obedecendo às normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Algumas figuras apresentadas neste texto foram elaboradas com o auxílio de ferramentas de inteligência artificial generativa, utilizadas exclusivamente para fins didáticos. Ressalta-se que tais recursos não foram empregados na geração, modificação ou análise de dados experimentais, sendo utilizados apenas para a representação visual de conceitos e procedimentos descritos ao longo do estudo. Todas as informações científicas apresentadas nas imagens foram definidas, revisadas e validadas pela autora.

6.3 Local de Estudo

Este estudo foi realizado nos Laboratórios de Bioestimulação e Reparo Tecidual e de Histologia e Terapia Regenerativa localizados no Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D) da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP).

6.4 Amostra

A amostra foi composta por 45 ratos machos (*Rattus norvegicus albinus*, *Wistar*), com 90 dias de idade, e peso aproximado de 330 ± 20 g. Os animais foram procedentes do Biotério de criação da UNICAMP (Campinas-SP) e passaram por um período de 7 dias para adaptação e treino na plataforma de análise de movimento, antes do início dos procedimentos experimentais. A determinação do tamanho amostral de 5 animais por grupo fundamentou-se nos preceitos éticos de experimentação animal, especificamente o princípio dos 3Rs (*Replacement, Reduction, Refinement*), em consonância com a Resolução Normativa nº 55 do CONCEA (2022) e diretrizes internacionais para modelos de lesão medular que preconizam o equilíbrio entre a robustez dos dados e a redução do uso de animais (Lilley *et al.*, 2020).

A seleção de animais machos foi adotada em função da prevalência de lesões medulares decorrentes de acidentes na população masculina, buscando maior correspondência com o perfil epidemiológico da condição estudada.

Durante o período de adaptação, os animais foram alojados em caixas de policarbonato transparente de alta resistência, forradas com serragem de pinho, com tampa própria de ferro, contendo dois recipientes com água e alimentação *ad libitum*. Estas caixas foram alocadas em rack ventilado no Biotério de Passagem do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D).

O experimento foi desenvolvido em ambiente mantido com iluminação artificial (lâmpada fluorescente), em ciclos de claro-escuro de 12 horas cada, considerando o período com luz desligada entre 07 e 19 horas, e temperatura controlada de 20 ± 2 °C, mantida por ar-condicionado. O desenvolvimento de toda a pesquisa foi planejado para minimizar o sofrimento dos animais.

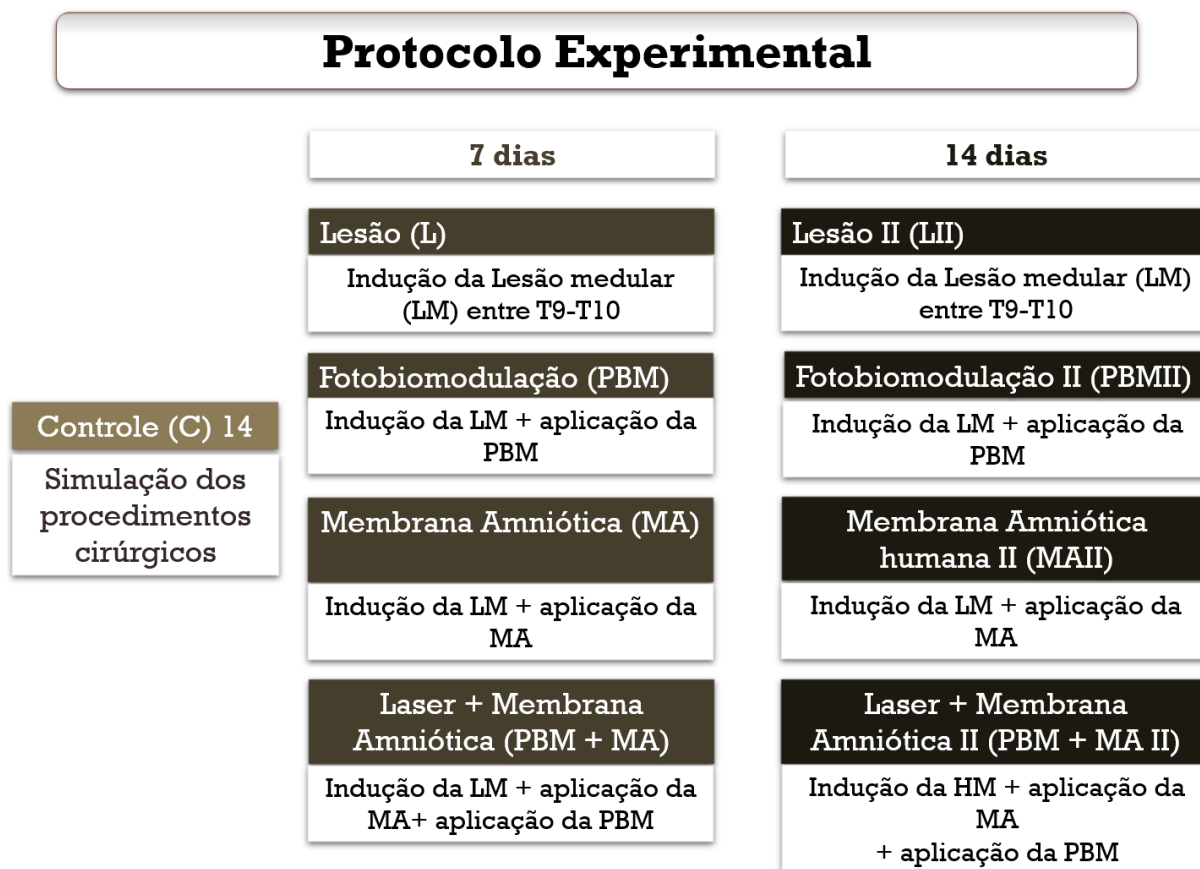
6.5 Grupos do Estudo

Os animais foram distribuídos em nove grupos experimentais, organizados em dois tempos experimentais distintos, de 7 e 14 dias. No tempo experimental de 7 dias, foram constituídos quatro grupos: L= Lesão; PBM= Fotobiomodulação; AM= Membrana Amniótica; e PBM+AM= Fotobiomodulação associada à Membrana Amniótica. No tempo experimental de 14 dias, foram constituídos cinco grupos: C=

Controle; LII= Lesão II; PBMII= Fotobiomodulação II; MA II= Membrana Amniótica II; e PBM+AM II= Fotobiomodulação associada à Membrana Amniótica II (Figura 3). Os respectivos protocolos experimentais dos grupos estão descritos a seguir.

- Controle (C) - Os animais foram submetidos exclusivamente aos preparativos pré-cirúrgicos, aos procedimentos anestésicos, e abertura e fechamento dos tecidos moles, sem indução da lesão medular. Este grupo foi adotado como controle comum aos dois tempos experimentais (7 e 14 dias), considerando a ausência de intervenções experimentais, em conformidade com os princípios éticos de redução do uso de animais.
- Lesão (L) e Lesão II (L II) - Animais submetidos aos preparativos pré-cirúrgicos e anestésicos e aos procedimentos cirúrgicos que incluíram a LM.
- Fotobiomodulação (PBM) e Fotobiomodulação II (PBM II) - Animais submetidos aos preparativos pré-cirúrgicos e anestésicos. A FBM foi aplicada imediatamente após os procedimentos cirúrgicos da LM e, posteriormente em dias alternados, de acordo com protocolo descrito no item 6.8.
- Membrana Amniótica (AM) e Membrana Amniótica II (AM II) - Animais submetidos aos preparativos pré-cirúrgicos, anestésicos e à indução da LM. Na sequência foi aplicado fragmento de MA (2 cm x 2 cm) recobrando totalmente a área da lesão.
- Fotobiomodulação + Membrana Amniótica (PBM+AM) e Fotobiomodulação + Membrana Amniótica II (PBM+AM II) - Animais submetidos aos preparativos pré-cirúrgicos, anestésicos, e aos procedimentos cirúrgicos que incluíram a LM e aplicação da MA. Após os procedimentos cirúrgicos e fechamento dos tecidos, os animais foram submetidos a aplicação da FBM seguindo o protocolo descrito para o grupo PBM.

Figura 3- Esquema do delineamento experimental mostrando a distribuição dos animais nos grupos Controle (C), Lesão (L), PBM, MA e PBM+MA após indução de lesão medular por contusão.



Fonte: Elaborado pelo autor.

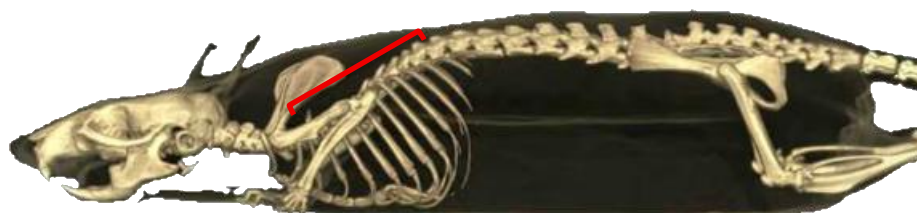
6.6 Protocolo Anestésico

Todas as intervenções cirúrgicas foram iniciadas com os procedimentos anestésicos utilizando Cetamina (50 mg/kg), Xilazina (5 mg/kg) e Acepran (0,01 mg/kg). A partir da imobilidade e perda do reflexo de endireitamento, o animal foi posicionado em decúbito ventral e imobilizado na mesa cirúrgica, mantendo-se a anestesia com inalação de mistura de O₂ e isoflurano a 2%.

6.7 Procedimentos Cirúrgicos

O procedimento cirúrgico foi iniciado, em todos os animais, com desinfecção da área cirúrgica com gaze embebido com povidine líquido, seguida de incisão na região torácica da medula espinhal do rato, situada a 7 cm da base da orelha do animal (Treuting; Dintzis; Montine, 2018). A medula espinhal foi exposta segundo protocolo modificado do relatado por Feitosa (2011). Inicialmente, foi executada incisão cutânea longitudinal, de aproximadamente 3 cm, na linha média dorsal do animal, com auxílio de bisturi nº 3 e lâmina nº 15. Em seguida, procedeu-se a incisão na fáscia dorsal, com dois cortes longitudinais e paralelos aos processos espinhosos das vértebras. Os músculos paravertebrais foram deslocados para expor os processos articulares das vértebras. Com auxílio de um alicate de corte e pinças foram removidos, cuidadosamente, os processos espinhosos T9 e T10 (Figura 4), expondo a medula espinhal.

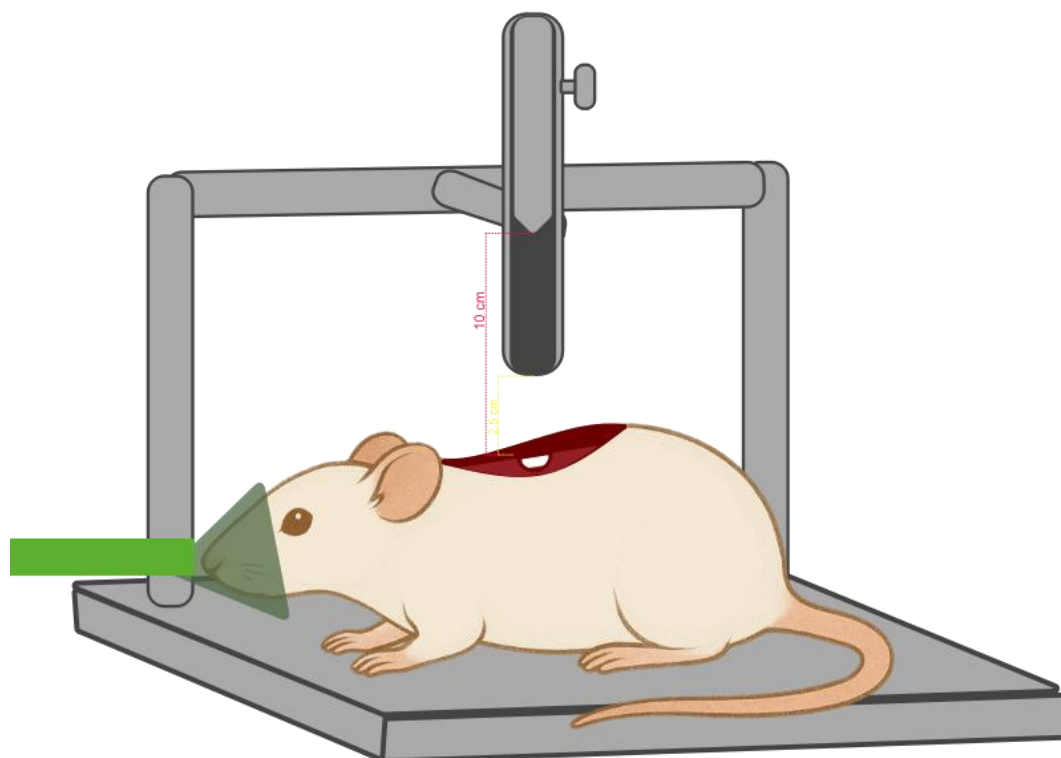
Figura 4- Imagem de tomografia do rato (região torácica)



Fonte: (Micheau; Hoa, 2018)

A LM foi induzida nos animais dos grupos L, AM, PBM, PBM+AM, AMII, PBMII e PBM+AMII por trauma direto, com a queda livre de um peso (10 g), suspenso em mini guilhotina (Figura 5), posicionado a 2,5 cm de altura, entre a extremidade que suporta o peso e a medula espinhal exposta, e 10 cm de altura entre a ponta do peso e a medula espinhal exposta, sendo retirado do local após transcorridos vinte segundos de contato (Correia *et al.*, 2025a; Falavigna *et al.*, 2013; Paula *et al.*, 2014). Os procedimentos relativos à exposição da ME e execução da LM foram apenas simulados no grupo Controle.

Figura 5- Procedimento experimental demonstrando rato sob anestesia inalatória com isoflurano e exposição da medula espinal, etapa preparatória para protocolo de indução de lesão medular (LM).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Ao final do procedimento cirúrgico, os tecidos foram reposicionados e suturados em dois planos: o plano muscular, com fio Ethicon 4-0 (Johnson & Johnson, Brasil), por ser absorvível, e o plano cutâneo, com fio de polipropileno 3-0 (Johnson & Johnson, Brasil), não absorvível, para melhor cooptação da pele. Após a sutura, a área operatória foi novamente assepsiada com solução de povidine e todos os animais foram submetidos às terapias: antibiótica- Pentakel (0,01 ml/Kg de peso, intramuscular, em dose única); analgésica - Cloridrato de tramadol (5 mg/kg, intramuscular, intervalos de 12h, por 5 dias) e dipirona (20mg/kg, oral, intervalos de 12h, por 5 dias).

Imediatamente após o procedimento cirúrgico e a interrupção da anestesia, os animais foram transferidos para uma caixa de recuperação, mantendo-os aquecidos e em decúbito ventral, com sedação residual e incapacidade momentânea de termorregulação autônoma por aproximadamente 2 horas, até a recuperação completa da consciência. Clinicamente, observa-se paralisia flácida (plegia) dos

membros pélvicos e ausência de reflexos abaixo do nível da lesão, caracterizando o quadro de lesão medular aguda.

A figura 6 apresenta um quadro ilustrativo contendo as principais etapas do procedimento cirúrgico realizado no modelo experimental de lesão medular, incluindo o preparo pré-operatório, a indução anestésica, a exposição da medula espinhal e o fechamento cirúrgico. As imagens têm caráter demonstrativo e visam facilitar a compreensão da sequência técnica empregada no protocolo experimental.

Figura 6-Etapas do procedimento cirúrgico para indução experimental de lesão medular em modelo murino.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Durante todo o período experimental, os animais foram monitorados diariamente para identificação e manejo de possíveis intercorrências clínicas associadas ao modelo de lesão medular por contusão. Entre as complicações previstas, destacou-se a autofagia ou autotomia, caracterizada por automutilação das extremidades dos membros pélvicos, geralmente relacionada à dor neuropática ou parestesia decorrente da perda de aferência sensorial. Também foi realizada vigilância diária para infecção do trato urinário e hematúria, condições associadas à bexiga neurogênica e à necessidade de expressão manual vesical pela manobra de

Credé, observando-se alterações como urina turva ou presença de sangue (Falavigna *et al.*, 2013; Paula *et al.*, 2014). Considerando o risco de úlceras de pressão decorrentes da imobilidade e da perda de sensibilidade nos membros pélvicos, os animais foram mantidos em cama macia de maravalha e submetidos à inspeção cutânea diária, conforme recomendações de Lilley *et al.* (2020). A perda de peso superior a 20% em relação ao peso pré-operatório foi estabelecida como critério adicional de ponto final humanitário, por indicar sofrimento intenso ou incapacidade de alimentação.

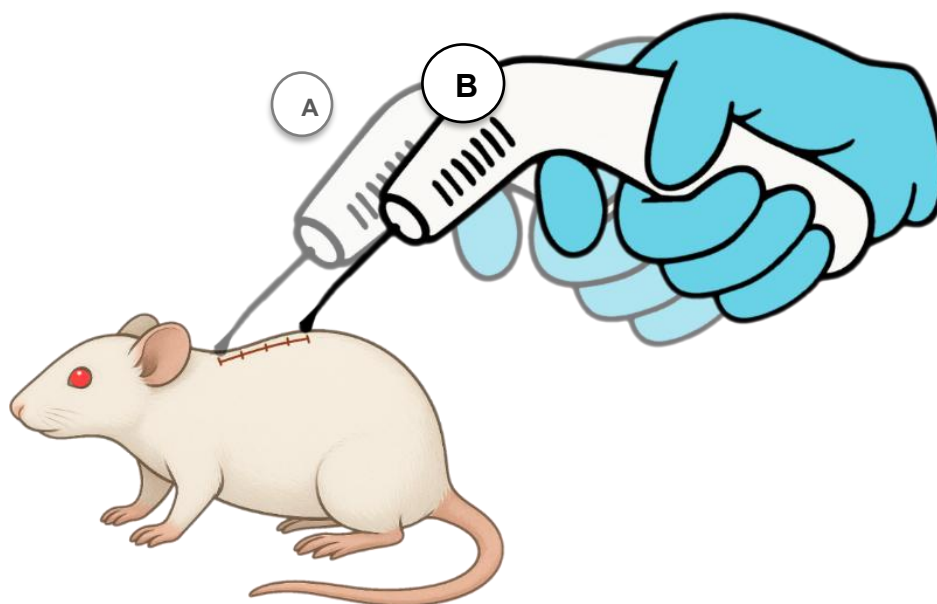
6.8 Protocolos de tratamento

Após a indução da LM, cada grupo experimental foi submetido ao protocolo terapêutico previamente estabelecido, descritos a seguir.

6.8.1 Fotobiomodulação (FBM)

Os animais dos grupos PBM, PBMII, PBM+AM e PBM+AM foram submetidos a aplicação da fototerapia, logo após finalizados os procedimentos cirúrgicos, que foram mantidos em dias alternados até a eutanásia.

Figura 7- Esquema representativo ilustrando os pontos de aplicação da fotobiomodulação ao longo da lesão medular, indicando o ponto inicial (A) e o ponto final (B).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Foi utilizado o equipamento Therapy EC (DMC Equipamentos, SP, Brazil), infravermelho (IR), com aplicação em dois pontos distintos, início e final da incisão cirúrgica, de forma transcutânea e perpendicular à pele do animal (Figura 7), seguindo os parâmetros apresentados na Tabela 1.

Tabela 1- Descrição detalhada dos parâmetros adotados para a aplicação da fotobiomodulação (PBM).

PARÂMETROS	LASER (DMC, modelo Therapy EC)
Exposição radiante (RE)	72 J/cm ²
Potência radiante (P)	100 mW (0,1W)
Comprimento de onda (λ)	808 nm (Infravermelho)
Área do feixe (A)	0,028 cm ²
Tempo (T)	20 s (por ponto)
Número de pontos	2
Periodicidade	Dias alternados
Modo de emissão	Contínuo
Método de aplicação	Contato
Irradiância (I)	3,6 W/cm ²
Energia radiante por ponto (E)	2 J
Energia radiante total	4 J

Fonte: Elaborado pelo autor.

6.8.2 Membrana Amniótica

Placentas humanas a termo foram obtidas na Santa Casa de São José dos Campos, a partir de cesárias eletivas de participantes com gestação normal e tempo gestacional igual ou superior a 39 semanas. A colheita da placenta foi precedida da apresentação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE A), sendo elucidadas possíveis dúvidas. Após sua concordância, o Termo foi assinado pelas participantes permitindo a colheita do material de interesse.

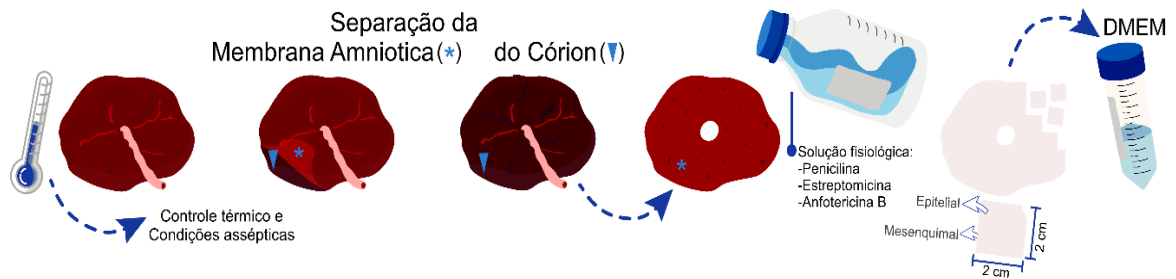
A seleção das participantes ocorreu no momento da recepção ou admissão na maternidade, a partir de convite da enfermeira em ambiente reservado. A participante recebeu informações sobre o protocolo a ser desenvolvido, que incluía a colheita da

placenta (de forma anônima, com atribuição de código numérico) e coleta de resultados sorológicos realizados no pré-natal de rotina da maternidade. Esse procedimento objetivava verificar com segurança a idade gestacional, e o histórico de Covid-19 e/ou sinais gripais nos últimos 14 dias, bem como resultados negativos para HIV-1 e 2, hepatite B e C e sífilis. Reforça-se que a colheita da placenta e suas membranas fetais, incluindo a membrana amniótica, foi realizada somente após o consentimento prévio da parturiente, pela assinatura do TCLE. Após o parto cesáreo, a placenta foi avaliada macroscopicamente pelo médico obstetra, e entregue à enfermeira, que a depositou em saco plástico estéril numerado, mantido sob refrigeração a 10 °C até a retirada do hospital.

As placentas foram colhidas de forma independente, conforme a disponibilidade das cesáreas eletivas ao longo do período de desenvolvimento da pesquisa, seguindo a rotina obstétrica da instituição, não havendo coleta simultânea ou agrupamento de tecidos. Cada unidade biológica foi considerada experimentalmente independente, sendo processada e utilizada individualmente, sem mistura entre amostras, assegurando controle sobre possíveis variáveis interindividuais.

A placenta foi transportada para o laboratório de Histologia e Terapia Regenerativa, sendo manualmente destacada do *córion* em condições estéreis. O processamento da MA incluiu lavagem extensiva com solução fisiológica contendo 100 U/ml de penicilina, 100 Ug/ml de estreptomicina e anfotericina B. A seguir, o biomaterial foi cortado em fragmentos de 2 cm x 2 cm, marcados com um corte diagonal no canto superior direito de forma a possibilitar a identificação dos lados epitelial e mesenquimal, e armazenados em temperatura ambiente, em tubos de 50 mL contendo meio de cultura DMEN sem adição de soro e fenol vermelho (Figura 8), em condições estéreis até o momento da aplicação nos animais, realizada após 24h (Arisawa *et al.*, 2017; Sant'Anna *et al.*, 2017).

Figura 8 - Coleta e processamento da Membrana Amniótica

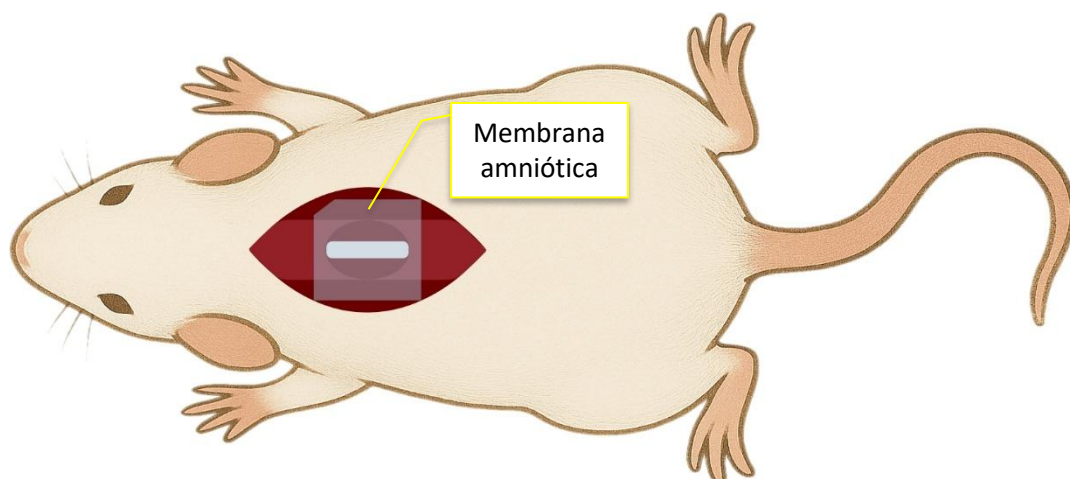


Fonte: Lima *et al*, 2026.

No dia subsequente à obtenção e processamento da MA, foram realizados os procedimentos cirúrgicos, iniciados com a aplicação dos anestésicos, tricotomia e demarcação da área cirúrgica dos animais que receberam este tratamento (AM e PBM+AM).

Nos animais dos grupos AM e PBM+AM foi aplicado, imediatamente após a LM, fragmento de MA (4 cm²), com a face mesenquimal voltada para a região medular (Figura 9), recobrendo toda a região da medula espinhal lesionada. Ressalta-se que o fragmento de membrana aderiu imediatamente aos tecidos circundantes à área da lesão, sem necessidade do uso de adesivos teciduais.

Figura 9- Simulação experimental representando um animal com a medula espinhal exposta e a aplicação de fragmento da membrana amniótica diretamente sobre a área da lesão.



Fonte: Elaborado pelo autor.

6.9 Protocolo de eutanásia

Os animais foram eutanasiados 7 ou 14 dias após os procedimentos cirúrgicos, conforme os períodos experimentais definidos no delineamento do estudo, sem nenhum tipo de sofrimento, com a administração de superdosagem dos anestésicos Cetamina (150 mg/kg), Xilazina (50 mg/kg) e Acepran (0,03 mg/kg), seguida da administração de Cloreto de Potássio (KCL 10 %, 0,78 mL/Kg), por via intracardíaca.

As amostras, objeto do estudo, foram cuidadosamente excisadas, identificadas e fixadas em formalina tamponada (10%), por 24 horas, com posterior encaminhamento para o processamento histológico de rotina.

6.10 Processamento Histológico

As amostras fixadas foram lavadas, para retirar o excesso de fixador, e transferidas para frascos com um composto quelante e descalcificador. Para tanto, foi utilizado o Etileno Diamino Tetra Acetato (EDTA), na proporção de 100 g EDTA + 1 Litro de água destilada, acrescido de 10 g de NaOH, composto orgânico que se liga ao íon cálcio removendo-o do tecido com alteração mínima. As amostras foram suspensas individualmente em frascos com essa solução, e os frascos foram agitados duas vezes ao dia, sendo trocada a solução a cada 2 dias, totalizando 10 trocas (Molinaro *et al.*, 2009).

Após finalizado esse procedimento, as amostras foram suspensas em álcool 70% até o momento do processamento histológico (desidratação, diafanização ou clarificação e impregnação), resultando em fragmentos com a rigidez adequada para execução dos cortes histológicos. Como a parafina é imiscível em água, a primeira etapa do processamento histológico consistiu na desidratação, que contempla a retirada da água dos tecidos e a sua substituição por álcool. Na segunda etapa, denominada diafanização, o álcool presente no tecido foi removido completamente e substituído pelo xilol. Na fase de impregnação, o xilol foi substituído por parafina fundida, dentro de uma estufa, a 60 °C. Com o auxílio de uma pinça previamente aquecida, a amostra de interesse foi incluída em moldes de metal, previamente identificados, contendo parafina líquida, com a superfície ventral voltada para baixo.

Considerando que a análise histopatológica é considerada padrão ouro na avaliação da evolução do reparo tecidual, as amostras foram seccionadas em cortes histológicos semiseriados de 5 µm com o auxílio de um micrótomo semiautomático Leica RM2245, cortadas com intervalo pré-determinado, de acordo com a região de centro da lesão. Os cortes histológicos foram corados, para a visualização e diferenciação do tecido medular, aplicando corantes não vitais, segundo o protocolo descrito por (Sant'Anna *et al.*, 2011): Hematoxilina (corante básico que destaca na cor roxa os componentes medulares ácidos) e Eosina (corante ácido, que destaca na cor rosa os componentes medulares básicos). Adicionalmente, foi utilizado o Luxol Fast Blue associado à Hematoxilina, que permite a identificação e quantificação de bainhas de mielina, corando-as em azul, enquanto a Hematoxilina complementa a coloração evidenciando os núcleos celulares. Essa combinação possibilitou a análise mais detalhada da integridade das fibras mielinizadas e das alterações na substância branca decorrentes da lesão medular e do tratamento.

6.11 Análise Microscópica

As lâminas foram analisadas por microscopia óptica no laboratório de Histologia e Terapia Regenerativa do Instituto de Pesquisa da Universidade do Vale do Paraíba e, posteriormente, foram captadas imagens digitais das lâminas com o auxílio de um sistema que compreendia microscópio Leica DM 2500 acoplado à câmera Leica DFC 425 e ao Leica Application Suite Program LAS v3.7. Complementarmente, com o auxílio de Scanner Digital Panoramic 250, do laboratório de Patologia na Universidade de São Paulo- USP, as lâminas histológicas foram escaneadas, obtendo-se imagens de regiões padronizadas da medula espinhal, captadas no aumento de 5x, permitindo ampliação em relação a área da medula. A partir das imagens digitais obtidas dos cortes histológicos dos fragmentos da medula espinhal avaliou-se a área da lesão qualitativamente e, utilizando o software ImageJ, quantitativamente.

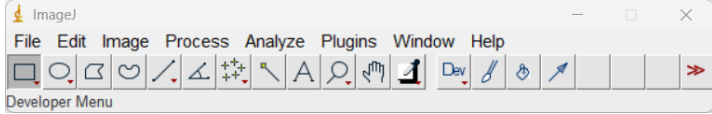
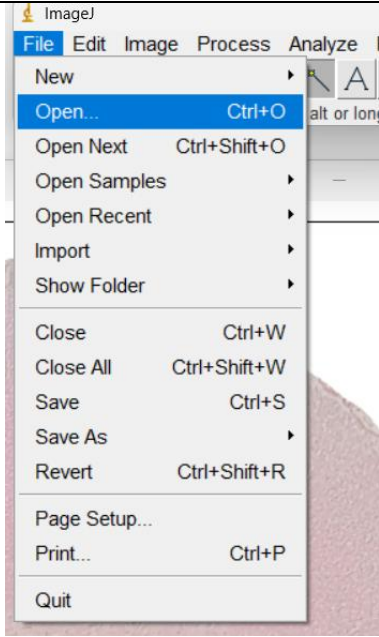
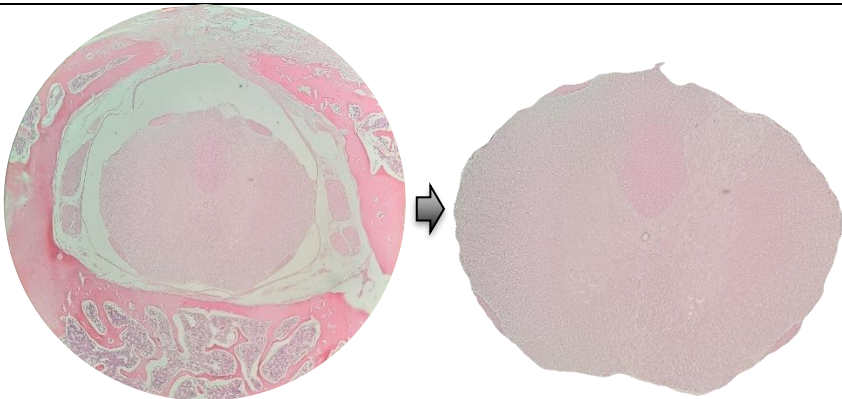
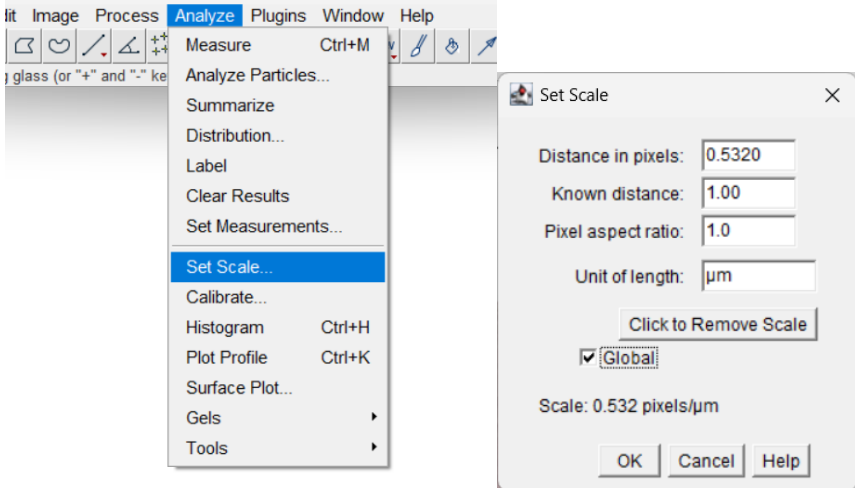
6.12 Procedimentos para quantificação dos dados

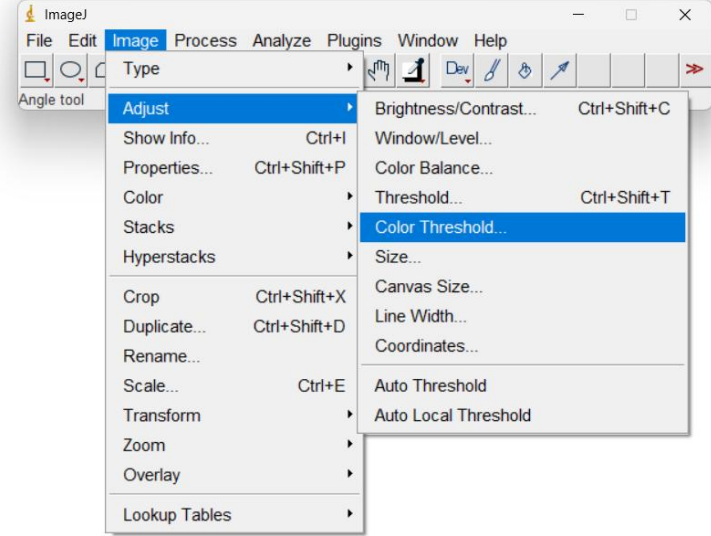
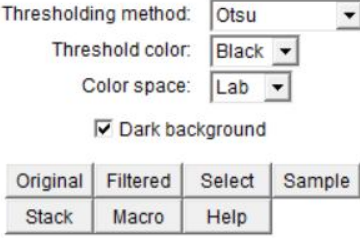
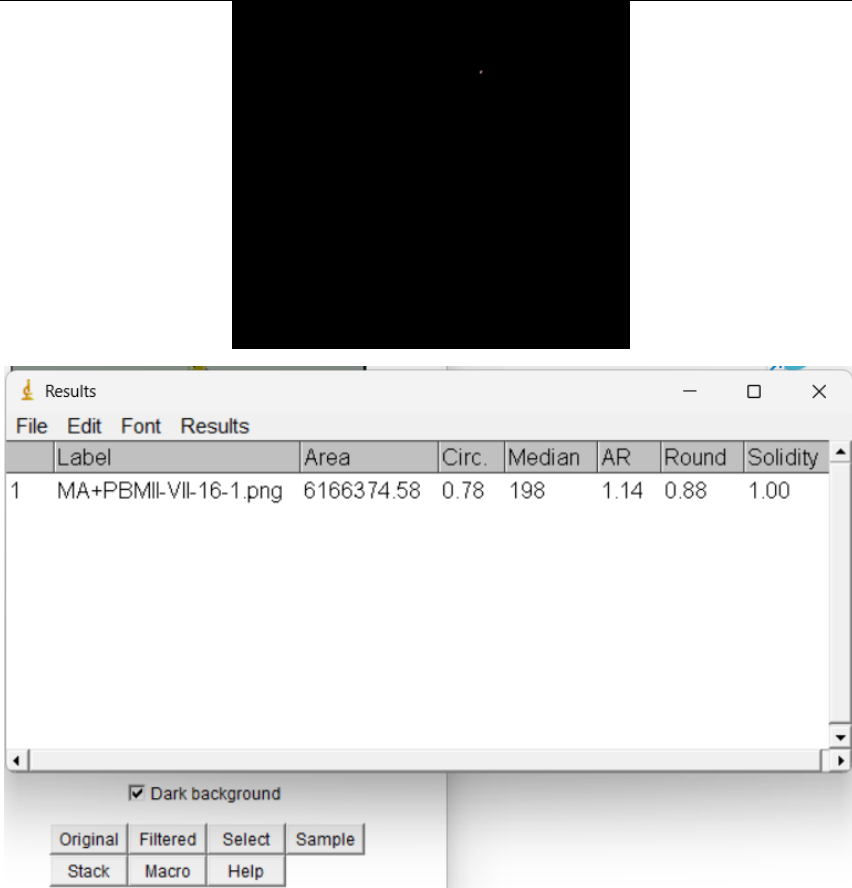
Para quantificação dos dados, foi utilizado o software ImageJ seguindo as etapas descritas a seguir. O procedimento detalhado para a mensuração quantitativa da área, utilizando o *software* ImageJ, foi executado em dez passos sequenciais, iniciando-se com a visualização da interface do ImageJ e a subsequente seleção e abertura da imagem a ser trabalhada.

Em seguida, todas as imagens foram ajustadas de acordo com a conformação anatômica da medula espinhal, aplicando-se os comandos *Freehand* e *Clear Outside*. Um passo crucial foi a manutenção da mesma escala para que todas as imagens fossem mensuradas igualmente. A calibração da escala (*Set Scale*) foi realizada mediante a definição da distância em *pixels*, distância conhecida, *Pixel aspect ratio* e a unidade de comprimento em μm , mantendo a opção *Global* marcada.

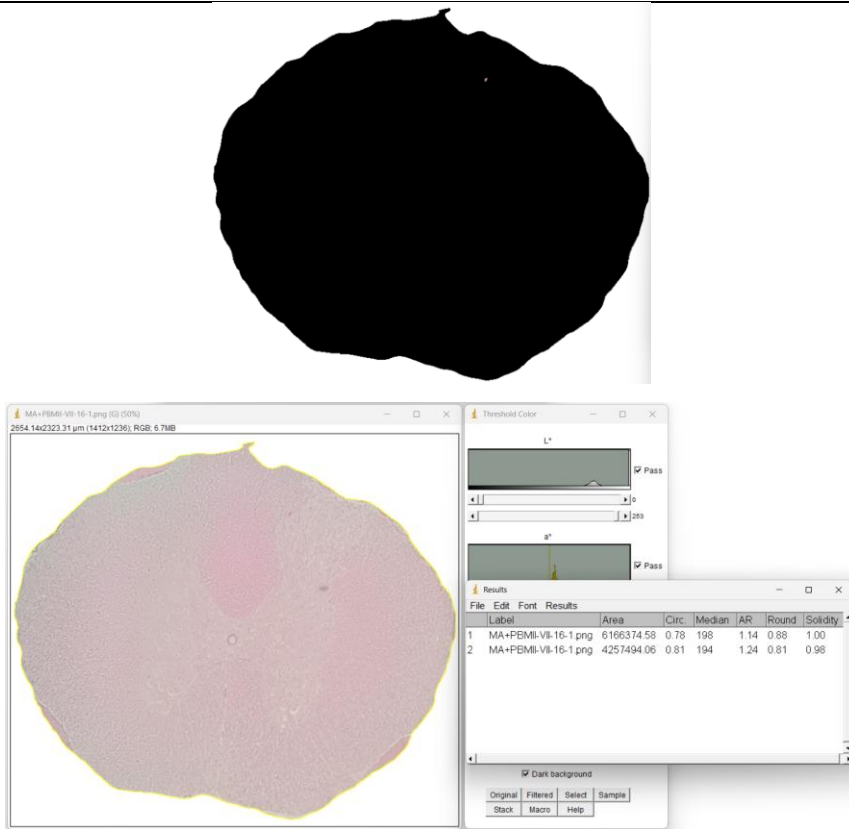
Para a análise e quantificação da área lesionada e do tecido, adotou-se o procedimento de *Color Threshold*, acessado pelo menu *Image > Adjust*. Dentro do *plugin*, foram selecionados os padrões de *Thresholding*, que incluíram o método "Otsu", a cor de *Threshold* "Black" e o *Color space* "Lab", com a opção *Dark background* marcada. A mensuração efetiva foi realizada em quatro etapas: na primeira etapa foi mensurada a área total da imagem; a segunda mensurou apenas a área ocupada pelo corte da medula; a terceira etapa consistiu na mensuração das áreas lesionadas (cavitações), que foram marcadas em preto e, após a seleção definitiva, contornadas em amarelo. Por fim, a quarta etapa mensurou as áreas com tecido observadas na medula, as quais também foram marcadas em preto e, após a seleção definitiva, contornadas em amarelo (Esquema 1).

Esquema 1- Passo a passo do procedimento realizado no software ImageJ para a mensuração da área

1		Interface do ImageJ;
2		Seleção e abertura da imagem a ser trabalhada;
3		Todas as imagens foram cortadas de acordo com a medula (Freehand + Clear Outside);
4		Foi mantida a mesma escala para que todas as imagens fossem mensuradas igualmente;

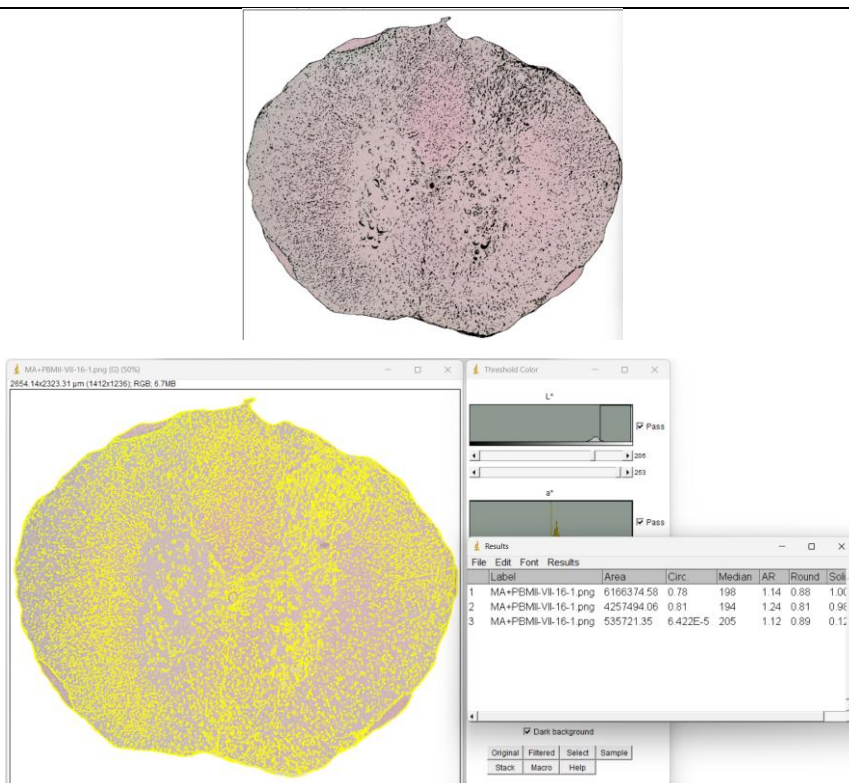
5		<p>Para análise e quantificação da área, foram adotados os seguintes passos:</p> <ul style="list-style-type: none"> -Image; -Adjust; -Color Threshold. 																
6		<p>Padrões selecionados dentro do plugin.</p>																
7	 <table border="1" data-bbox="300 1442 1155 1850"> <thead> <tr> <th></th> <th>Label</th> <th>Area</th> <th>Circ.</th> <th>Median</th> <th>AR</th> <th>Round</th> <th>Solidity</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>MA+PBMII-VII-16-1.png</td> <td>6166374.58</td> <td>0.78</td> <td>198</td> <td>1.14</td> <td>0.88</td> <td>1.00</td> </tr> </tbody> </table>		Label	Area	Circ.	Median	AR	Round	Solidity	1	MA+PBMII-VII-16-1.png	6166374.58	0.78	198	1.14	0.88	1.00	<p>A primeira etapa consistiu em mensurar a área total da imagem;</p>
	Label	Area	Circ.	Median	AR	Round	Solidity											
1	MA+PBMII-VII-16-1.png	6166374.58	0.78	198	1.14	0.88	1.00											

8



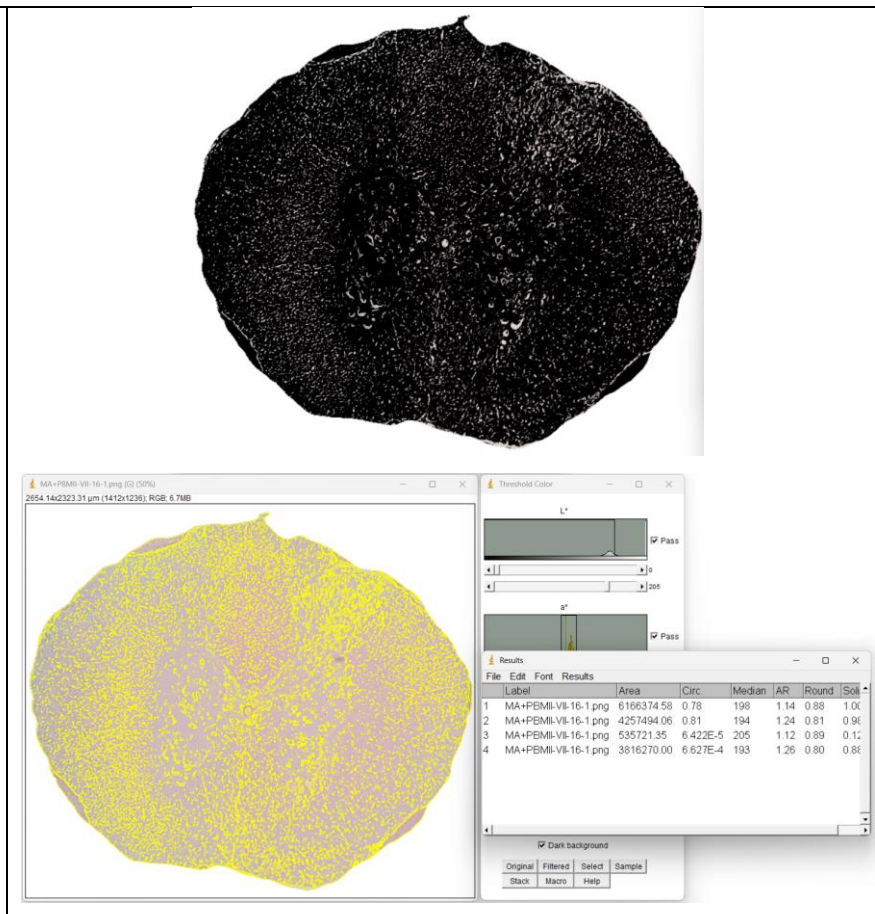
Na segunda etapa foi mensurada apenas a área ocupada pelo corte da medula;

9



Na terceira etapa foram mensuradas as áreas lesionadas presentes na medula espinhal (cavitações), marcadas em preto, e após seleção definitiva, contornadas em amarelo

10



A quarta etapa consistiu em mensurar as áreas com tecido, observados na área da medula, marcadas em preto, e após seleção definitiva, contornadas em amarelo

Fonte: Elaborado pelo autor

A partir dos resultados das mensurações do software ImageJ, foram criadas planilhas no Microsoft Excel (APENDICE B) e os dados foram analisados e conferidos em dois programas. Primeiro com o auxílio do programa Microsoft Excel, com o teste ANOVA e, em sequência, utilizando o MATLAB, software de programação e computação numérica para análise de dados. Complementando o ANOVA, foi aplicado o teste de Tukey e, com o Google Colab, foram gerados os gráficos resultantes da análise estatística e boxplot.

6.13 Análise de movimento

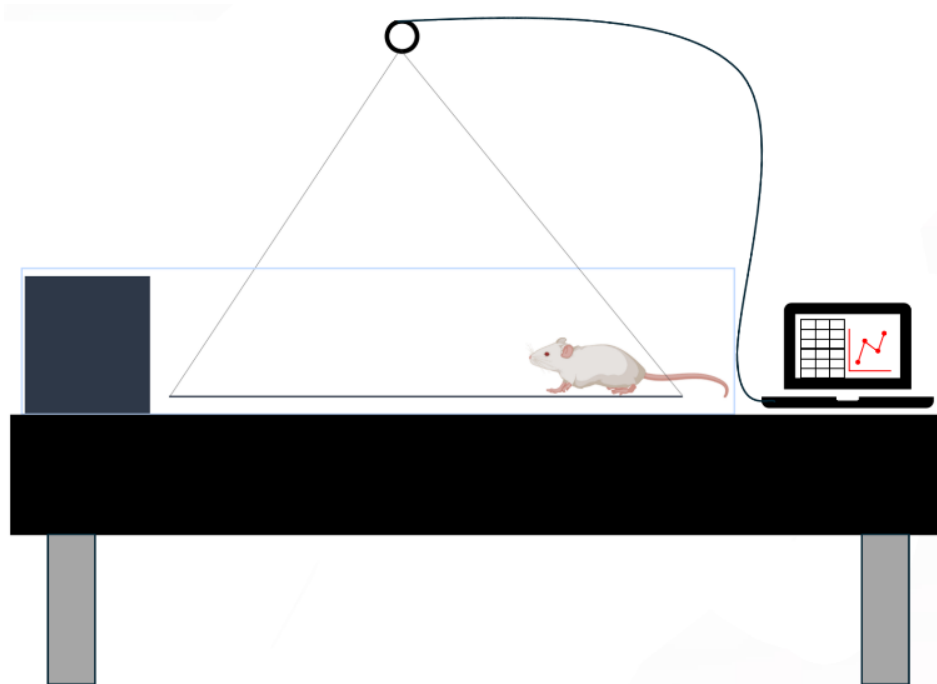
Para realização da análise, foi desenvolvida, pelo nosso grupo de estudos, uma plataforma móvel, suspensa e sustentada por fios, posicionada dentro de uma caixa de vidro transparente. Foi estabelecido um protocolo que utilizou a mensuração de velocidade média e FRS avaliando o desempenho da marcha de cada um dos animais (Beloni *et al.*, 2025a). Os dados da FRS foram obtidos pela distribuição média da força

de reação do solo (em N) exercida pelos animais de cada grupo conforme o tempo (em s) em que deslocava pela plataforma. Os dados obtidos (APENDICE C) foram exportados em formato TXT para análise feita no software MATLAB®, onde foi calculado o coeficiente linear entre a trajetória (em centímetros) e o tempo de deslocamento (em segundos) e plotado o gráfico de distribuição de força (FRS).

Durante o período de adaptação dos animais, antes das cirurgias, eles foram treinados a percorrer o trajeto da plataforma dentro da caixa de vidro. As análises de movimento de cada grupo foram realizadas de acordo com os tempos experimentais propostos, que foram: Dia 0 (zero), ou seja, antes do procedimento cirúrgico, e aos 3 e 7 dias pós cirurgia.

Conforme os animais se deslocavam pela plataforma (Figura 10), a célula de carga captava a força do peso distribuída ao longo do trajeto, e a convertia em força de reação do solo, permitindo avaliar a distribuição de força ao longo do trajeto.

Figura 10- Esquema ilustrativo da configuração experimental utilizada para a mensuração da força de reação do solo.



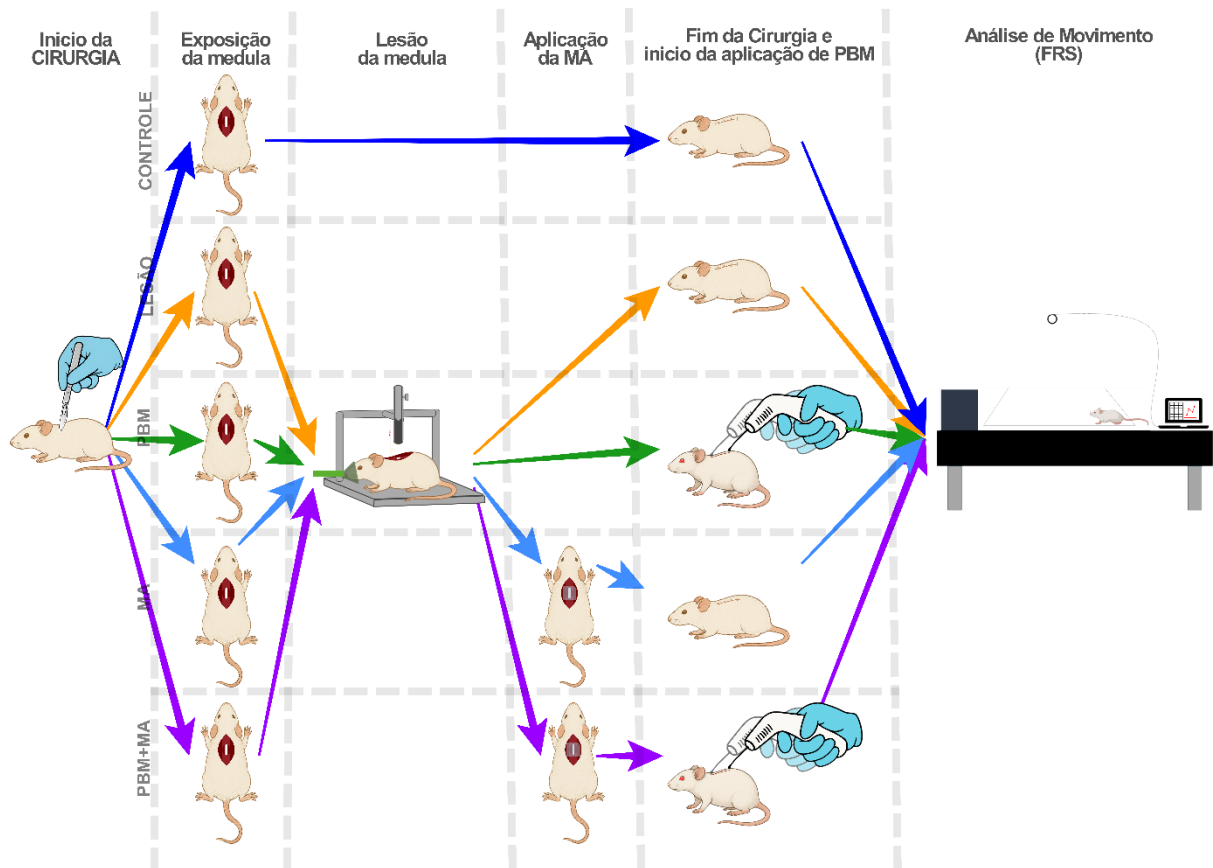
Fonte: Elaborado pelo autor.

A partir dos dados obtidos foi gerado um gráfico para cada grupo, apresentando os resultados de cada dia analisado intragrupo nos tempos experimentais determinados de 0, 3, 7 e 14 dias.

As mensurações extraídas foram organizadas em planilhas no Microsoft Excel (APENDICE C) e os dados analisados e conferidos em dois programas. Primeiro com o auxílio do programa Microsoft Excel, com o teste ANOVA e, em sequência, utilizando o MATLAB, software de programação e computação numérica para análise de dados. Complementarmente ao ANOVA, foi aplicado o teste de Tukey para verificação das análises estatísticas.

O fluxograma a seguir (Figura 11) representa a sequência metodológica desde a indução da lesão medular por contusão, a distribuição dos animais nos diferentes grupos experimentais e protocolos terapêuticos, até a avaliação funcional por análise de movimento.

Figura 11- Esquema ilustrativo do delineamento experimental e aplicação dos tratamentos



Fonte: Elaborado pelo autor.

6.14 Análise Estatística

Os dados obtidos das análises de movimento e microscópicas foram organizados em planilhas no Microsoft Excel (Apêndices B e C) e submetidos à análise estatística, considerando separadamente as variáveis histológicas e funcionais, de acordo com suas características específicas.

Para a análise histológica, a partir das mensurações realizadas no software ImageJ, foram obtidos os valores referentes a área total do corte da medula espinhal e à área ocupada pelas cavitações teciduais. Com o objetivo de padronizar os dados e permitir a comparação entre os grupos experimentais, os resultados foram expressos em porcentagem de área cavitada, calculada pela razão entre a área total das cavitações e a área total do corte da medula, multiplicada por 100.

Para a análise funcional, os dados provenientes da avaliação de movimentos foram organizados de acordo com os grupos experimentais e tempos de avaliação, possibilitando verificar a evolução funcional ao longo do período experimental. Para cada grupo, foram gerados gráficos representativos dos resultados obtidos em cada dia de análise, permitindo a comparação intragrupo, bem como entre os grupos experimentais, ao longo do tempo.

Inicialmente, os dados foram avaliados quanto à consistência e organização, atendendo aos pressupostos necessários para a aplicação de testes estatísticos paramétricos. Em seguida, foi aplicada a análise de variância (ANOVA) para comparação dos resultados entre os grupos experimentais e entre os diferentes tempos de avaliação, adotando-se nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Quando identificadas diferenças estatisticamente significativas, foi utilizado o teste post hoc de Tukey, com o objetivo de identificar especificamente quais grupos ou tempos experimentais diferiram entre si.

As análises estatísticas foram realizadas inicialmente no Microsoft Excel e posteriormente confirmadas software de programação e computação numérica para análise de dados, MATLAB, assegurando maior robustez e confiabilidade aos resultados obtidos. A representação gráfica dos dados, incluindo gráficos e boxplots, foi utilizada como ferramenta complementar para a visualização da distribuição dos dados e das diferenças observadas entre os grupos e ao longo do tempo experimental.

7 RESULTADOS

A avaliação microscópica foi conduzida com o objetivo de investigar de forma abrangente as alterações teciduais decorrentes da lesão e dos diferentes protocolos de tratamento, a partir de lâminas coradas com Hematoxilina e Eosina (H&E) e Luxol Fast Blue (LFB). Para isso, foram empregadas duas abordagens que se complementam: a análise qualitativa e a quantitativa. A análise qualitativa permite a descrição detalhada das características morfológicas observadas nos cortes histológicos, evidenciando alterações estruturais, grau de preservação ou desorganização das fibras nervosas, bem como a presença e a dimensão de cavitações (Figuras 12 e 16). Por sua vez, a análise quantitativa busca mensurar objetivamente esses achados, fornecendo parâmetros comparativos entre os grupos experimentais e possibilitando a avaliação estatística das diferenças observadas (Figuras 13 e 17).

7.1 Tempo Experimental – 7 DIAS

7.1.1 Análise Qualitativa

A seguir estão descritos os resultados da análise qualitativa dos cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina (H&E) dos espécimes dos grupos C, I, PBM, AM e PBM+AM.

Grupo Controle (C)

O grupo C, submetido apenas aos procedimentos cirúrgicos iniciais e a simulação da LM, foi considerado como padrão histológico normal do tecido da medula espinhal para comparação com os demais grupos estudados (L, PBM, AM, PBM+AM). Nos espécimes desse grupo foram observadas fibras nervosas dispostas com arranjo em malha característico, e a presença de células da glia, na substância branca, enquanto na cinzenta eram visíveis neurônios e suas projeções, circundados por células da glia.

Grupo L

A análise qualitativa dos espécimes do grupo L permitiu observar que as fibras nervosas apresentavam inúmeras áreas de cavitação, em virtude da destruição

dessas fibras na região da lesão medular. Conseqüentemente, também era possível visualizar a redução de neurônios e de células da glia.

Grupo PBM

Por outro lado, nos cortes histológicos dos animais do grupo PBM foi possível observar áreas reduzidas de cavitação, concentradas na região dorsal da substância branca, com maior preservação tecidual, com a presença de neurônios e células da glia principalmente na substância cinzenta, em comparação com os aspectos histológicos observados no grupo L.

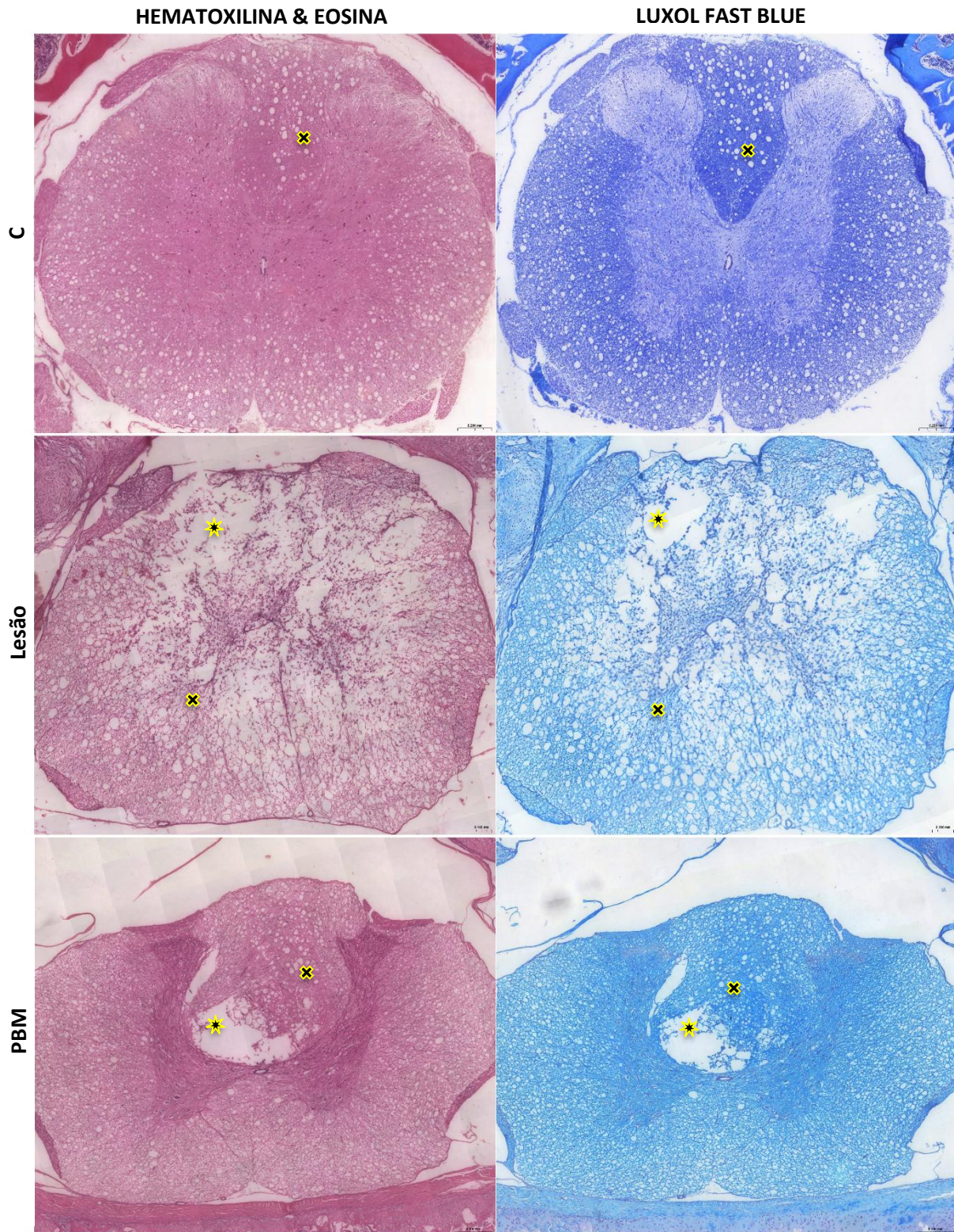
Grupo AM

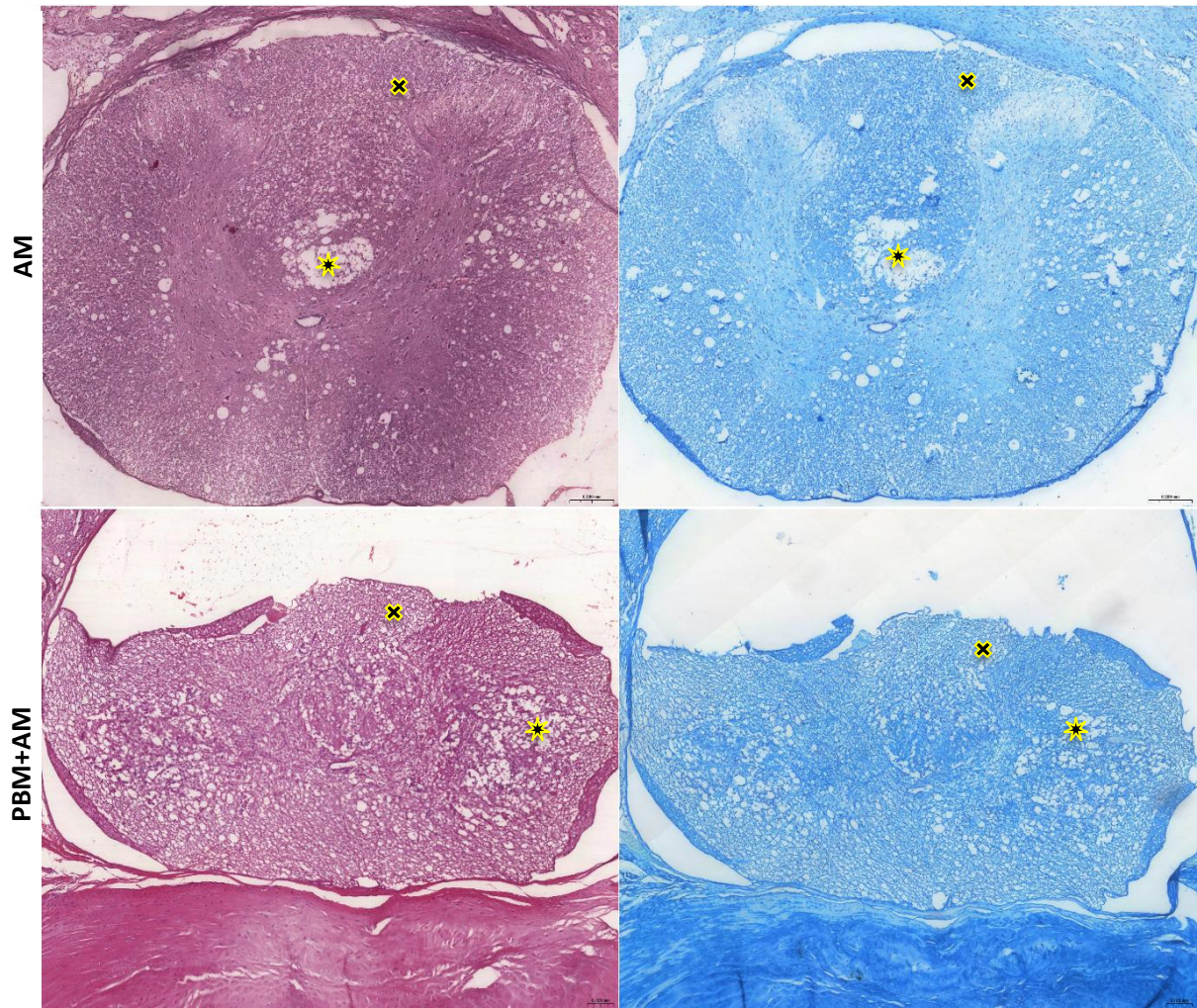
A análise qualitativa dos cortes histológicos dos animais do grupo AM também evidenciou áreas de cavitação espalhadas pela estrutura tecidual e a preservação de neurônios e células gliais na substância cinzenta, comparada ao grupo L.

Grupo PBM+AM

Por sua vez, os cortes histológicos dos animais do grupo PBM+AM também apresentaram áreas de cavitação de menor extensão, quando comparadas às observadas no grupo L, e a preservação de neurônios e células da glia na substância cinzenta.

Figura 12- Fotomicrografias dos cortes da medula espinhal avaliando a morfologia tecidual nos grupos de 7 dias. À esquerda, Hematoxilina & Eosina (H&E) para avaliação da arquitetura celular geral; à direita, Luxol Fast Blue (LFB) associado à Hematoxilina





Fonte: Elaborado pelo autor.

A análise qualitativa dos dados obtidos dos cinco grupos apresentou diferenças marcantes e significativas. Os cortes histológicos das amostras dos animais do grupo controle apresentaram arquitetura preservada, sem alterações relevantes. Por sua vez, os cortes histológicos das amostras dos animais do grupo L revelaram grandes áreas de cavitação, acompanhadas da distribuição desorganizadas das fibras nervosas. A análise dos cortes histológicos dos grupos submetidos aos diferentes protocolos de tratamento (PBM, AM e PBM+AM), apresentavam áreas de cavitação de tamanho reduzido em comparação às observadas no grupo L.

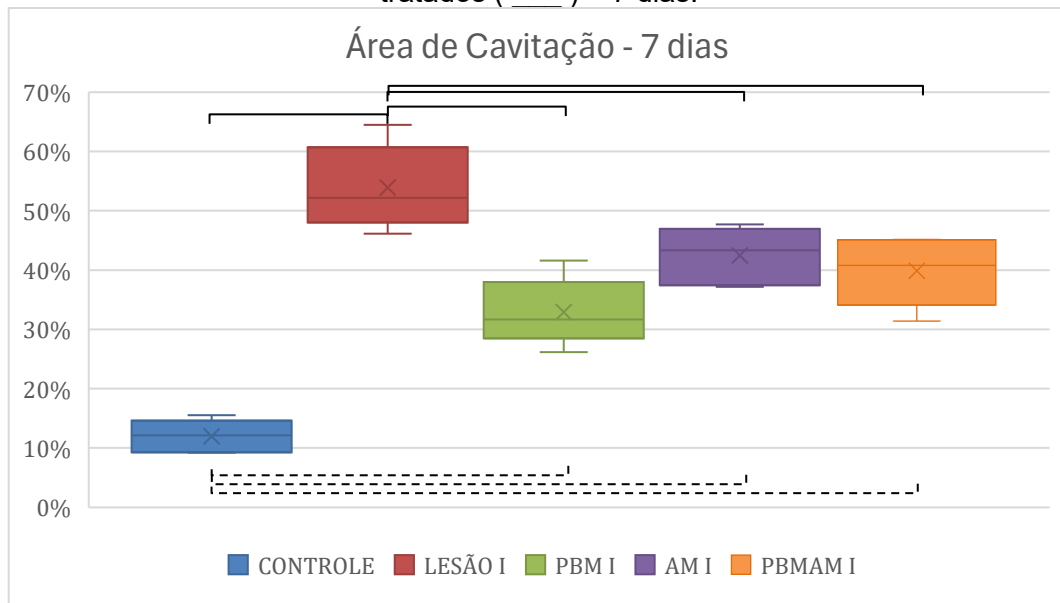
7.1.2 Análise Quantitativa

A seguir, apresentam-se os resultados da análise quantitativa obtidos a partir das imagens processadas no software ImageJ. Os valores foram submetidos aos cálculos estatísticos utilizando o Google Colab, e os gráficos correspondentes (Figura 13) foram gerados no Microsoft Excel.

A aplicação do teste de Tukey (Tabela 2) evidenciou diferença estatisticamente significativa entre os grupos C e L (C x L), revelando que os animais do grupo L apresentaram alterações compatíveis com o quadro esperado de lesão medular, em contraste com a integridade observada no grupo C.

A comparação dos resultados obtidos nos grupos PBM, AM e PBM+AM, ao grupo C também apresentou diferenças estatisticamente significativas, indicando que os tratamentos aplicados não alcançaram parâmetros semelhantes aos observados no grupo C. Por outro lado, ao comparar os resultados dos grupos tratados ao grupo L, foram observadas diferenças estatisticamente significativas, sugerindo efeito benéfico de todos os protocolos de tratamento utilizados (Figura 13).

Figura 13- Gráfico comparativo da porcentagem das áreas de cavitação em cada grupo com indicativo de significância estatística entre os grupos controle e tratados (_ _ _) e lesão e tratados (_ _) – 7 dias.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Embora o gráfico indique, visualmente, possível diferença nos resultados obtidos entre os grupos tratados (PBM > PBM+AM > AM), as diferenças detectadas não foram estatisticamente significantes.

Tabela 2- Análise Estatística das Diferenças entre os Grupos C, L, PBM, AM E PBM+AM (7 dias) por Meio do Teste de Comparações Múltiplas de Tukey, Evidenciando as Relações Significativas entre os Tratamentos

group1	group2	meandiff	p-adj	lower	upper	reject
Controle	L	41.962	0.0000	31.4178	52.5062	VERDADEIRO
Controle	AM	30.464	0.0000	19.9198	41.0082	VERDADEIRO
Controle	PBM+AM	27.878	0.0000	17.3338	38.4222	VERDADEIRO
Controle	PBM	20.952	0.0001	10.4078	31.4962	VERDADEIRO
L	AM	-11.498	0.0236	-21.7700	-1.226	VERDADEIRO
L	PBM+AM	-14.084	0.0045	-24.356	-3.812	VERDADEIRO
L	PBM	-21.01	0.0000	-31.282	-10.738	VERDADEIRO
AM	PBM+AM	-2.586	0.9409	-12,858	7.686	FALSO
AM	PBM	-9.512	0.0779	-19.784	0.76	FALSO
PBM+AM	PBM	-6.926	0.2937	-17.198	3.346	FALSO

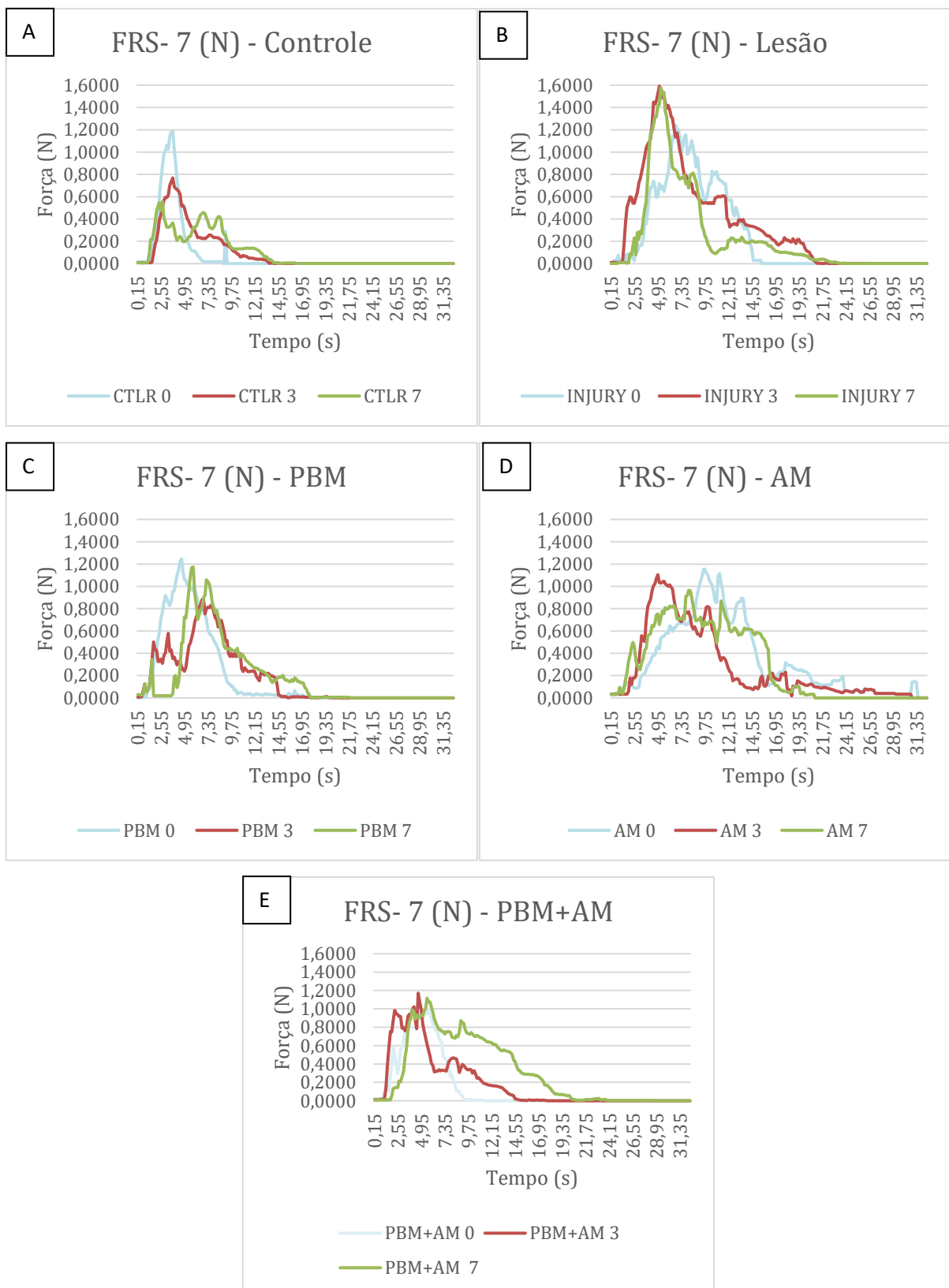
Fonte: Elaborado pelo autor.

7.1.3 Análise de Movimento

A figura 14 (A, B, C, D e E) apresenta os gráficos de distribuição da força, em Newtons (eixo y), ao longo do tempo, em segundos (eixo x). Cada curva corresponde aos valores médios obtidos em cada um dos cinco grupos experimentais (C, L, PBM, AM e PBM+AM), em diferentes momentos: dia 0 (linha azul), aos 3 (linha vermelha) e 7 (linha verde) dias após LM, permitindo interpretar que cada pico representa fases distintas do contato da pata do animal com o solo.

O primeiro pico está, geralmente, associado ao impacto inicial do calcanhar (fase de aceitação de peso), enquanto o segundo pico está ligado à fase de propulsão, quando o pé empurra o solo para impulsionar o corpo para frente. A amplitude dos picos indica a magnitude da força gerada, onde valores mais altos sugerem maior intensidade de impacto ou propulsão, enquanto valores menores podem indicar absorção reduzida do impacto ou déficit de força. A largura (duração) de cada curva indica o tempo de aplicação dessa força, podendo revelar alterações na cadência, na velocidade ou na estabilidade. Nota-se que o segundo pico é mais alto que o primeiro, sugerindo que a fase de propulsão foi mais intensa do que a fase de impacto, sugerindo um padrão de marcha com maior ênfase no impulso final.

Figura 14– Gráficos de Força de reação de solo dos grupos eutanasiados em 7 dias, em Newtons (N), dos grupos C, L, AM, PBM e PBM+AM, apresentando os dados de coletados aos 0, 3 e 7 dias de análise de FRS



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 15- Análise estatística dos valores de significância (p-valor) das comparações entre grupos na avaliação biomecânica (FRS) aos 7 dias.

	C x L	C x PBM	C x AM	C x PBM+AM	L x PBM	L x AM	L x PBM+AM	PBM x AM	PBM x PBM+AM	AM x PBM+AM
Dia 3	0.0030	0.0042	0.0059	0.0041	0.0019	0.0011	0.0049	0.0033	N/A	0.0052
Dia 7	0.0038	0.0041	0.0012	0.0081	0.0066	0.0005	0.0034	0.0006	0.0001	N/A

Fonte: Elaborado pelo autor.

A avaliação da Força de Reação do Solo (FRS) no período de 7 dias demonstrou alterações significativas no padrão locomotor dos animais. A validação do modelo de lesão foi confirmada pela diferença estatisticamente significativa (Figura 15) entre os Grupos C e L ($p=0,0038$), evidenciando o déficit funcional agudo provocado pela contusão medular.

Em relação à eficácia terapêutica, todos os protocolos de tratamento apresentaram resultados superiores à ausência de intervenção. As comparações entre o Grupo L e os grupos tratados revelaram diferenças estatisticamente significativas para PBM ($p=0,0066$), AM ($p=0,0005$) e PBM+AM ($p=0,0034$). Estes dados indicam que todas as intervenções foram eficazes em atenuar o declínio funcional na fase aguda/subaguda.

A comparação direta entre os protocolos terapêuticos revelou diferenças marcantes no desempenho biomecânico. Observou-se diferença estatística altamente significativa entre os grupos PBM e AM ($p=0,0006$), bem como entre os grupos PBM e PBM+AM ($p=0,0001$). Estes achados sugerem que, neste período experimental, a aplicação isolada da fotobiomodulação promoveu um padrão de recuperação distinto e superior quando comparada à aplicação isolada da membrana ou à terapia combinada.

Do ponto de vista funcional, tais resultados complementam a interpretação das variáveis de FRS ao longo do tempo. O grupo AM, embora estatisticamente distinto dos demais, exibiu um padrão locomotor menos eficiente incluindo maiores valores de pico máximo, atrasos no tempo de pico e prolongamento do tempo de deslocamento. Em contraste, o grupo PBM+AM, apesar de apresentar diferenças estatísticas em diversas comparações, demonstrou desempenho locomotor mais próximo dos grupos PBM e C, especialmente nos parâmetros temporais, sugerindo melhora funcional mais integrada. Assim, enquanto AM isolado promoveu ganhos modestos e pouco coordenados, a combinação PBM+AM apresentou comportamento mais eficiente,

aproximando-se dos efeitos observados com PBM, indicando possível efeito complementar ou sinérgico entre as abordagens terapêuticas.

7.2 Tempo Experimental – 14 DIAS

7.2.1 Análise Qualitativa

A seguir estão descritos os resultados da análise qualitativa dos cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina (H&E) e Luxol Fast Blue (LFB) dos espécimes dos grupos C, L II, PBM II, AM II e PBM+AM II (Figura 16).

Grupo C

O grupo C, submetido apenas aos procedimentos cirúrgicos iniciais e a simulação da LM, foi considerado como padrão histológico normal do tecido da medula espinhal para comparação com os demais grupos estudados (L II, PBM II, AM II e PBM+AM II). Nos espécimes do grupo C foram observadas fibras nervosas dispostas com arranjo em malha característico, e a presença de células da glia, na substância branca, enquanto na cinzenta eram visíveis neurônios e suas projeções, circundados por células da glia.

Grupo L II

A análise qualitativa dos espécimes do grupo L II também revelou extensas áreas de cavitação nas fibras nervosas, decorrentes do processo de degeneração tecidual na zona da lesão medular. Observou-se, simultaneamente, uma redução acentuada nas populações de células neuronais e gliais.

Grupo PBM II

Em contraste, os cortes histológicos do grupo PBM II exibiram áreas de cavitação restritas e focalizadas, sugerindo uma preservação tecidual superior. Essa integridade estrutural foi corroborada pela maior densidade de neurônios e células gliais na substância cinzenta em comparação aos demais grupos.

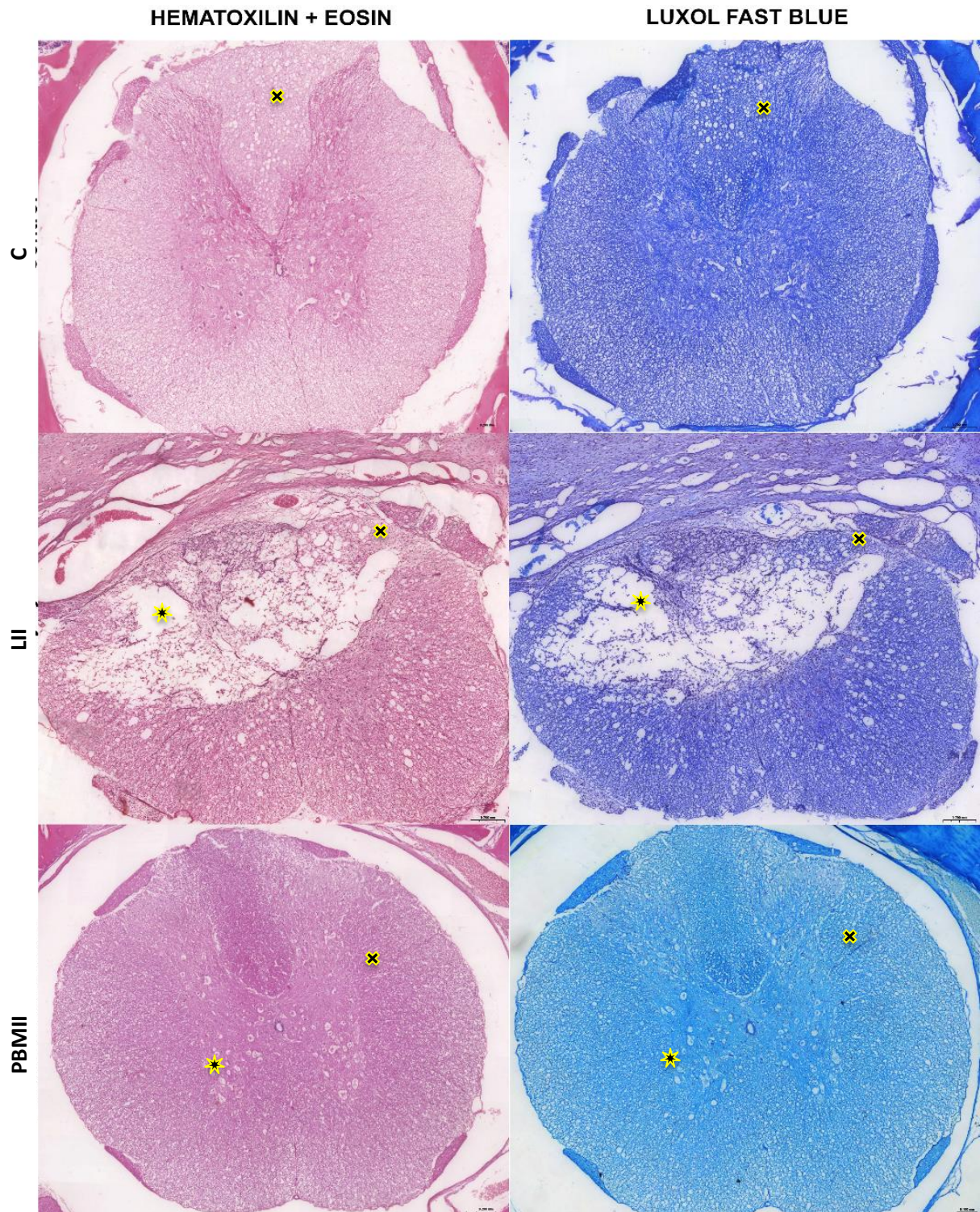
Grupo AM II

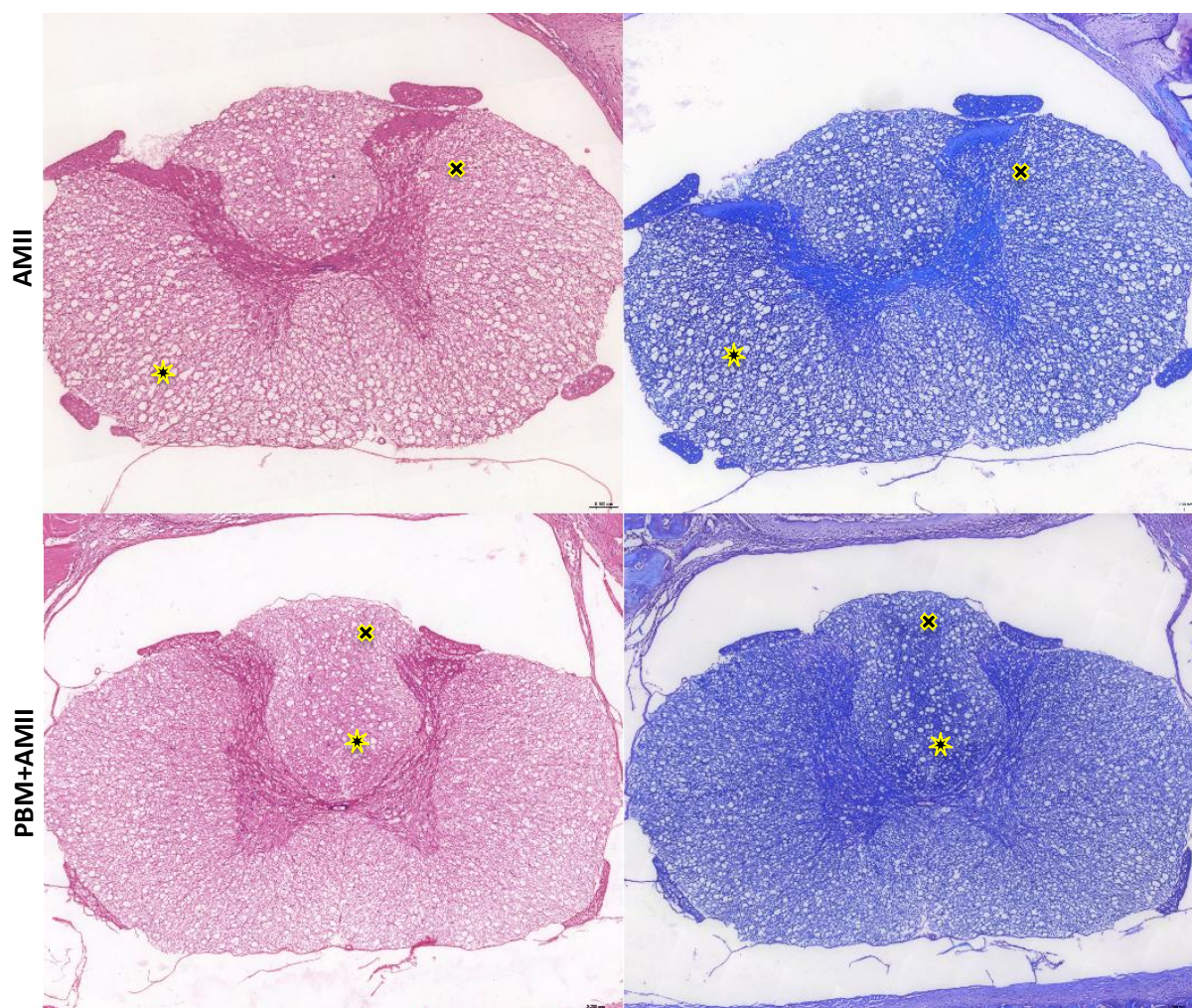
Os animais do grupo AM, os cortes histológicos revelaram cavitações disseminadas pelo parênquima, embora tenha evidenciado, simultaneamente, preservação na densidade de neurônios e células gliais na substância cinzenta, comparado ao grupo L II.

Grupo PBM+AM II

No grupo PBM+AM II, a análise histológica revelou cavitações significativamente reduzidas em comparação ao grupo L, aproximando-se do padrão morfológico observado no grupo C. Adicionalmente, observou-se maior densidade de neurônios e células da glia na substância cinzenta, sugerindo preservação celular em comparação ao grupo L.

Figura 16 - Fotomicrografias dos cortes da medula espinhal avaliando a morfologia tecidual nos grupos de 14 dias. À esquerda, Hematoxilina & Eosina (H&E) para avaliação da arquitetura celular geral; à direita, Luxol Fast Blue (LFB) associado à Hematoxilina para evidenciar a integridade das bainhas de mielina (em azul). (*) indica áreas de cavitação cística decorrentes de necrose tecidual; (x) indica a disposição das fibras nervosas.





Fonte: Elaborado pelo autor.

A análise dos resultados qualitativos dos cortes histológicos obtidos aos 14 dias pós LM revelou que o grupo C manteve a arquitetura tecidual plenamente preservada, com integridade das bainhas de mielina, evidenciada pela coloração uniforme com LF&B. Em contraste, o grupo LII exibiu evidente severa progressão nos danos teciduais, caracterizada por extensas áreas de cavitação, de aspecto cístico, com consequente ausência de mielina nessas regiões, indicando desorganização tecidual persistente. Por outro lado, os grupos que receberam protocolos de tratamento, PBMII, AMII e PBM+AMII, apresentaram aspectos distintos do grupo LII. Embora fossem visíveis sinais de lesão tecidual, as áreas de cavitação eram de dimensões reduzidas associadas à manutenção da substância branca, observada pela coloração da mielina remanescente com LFB.

7.2.2 Análise Quantitativa

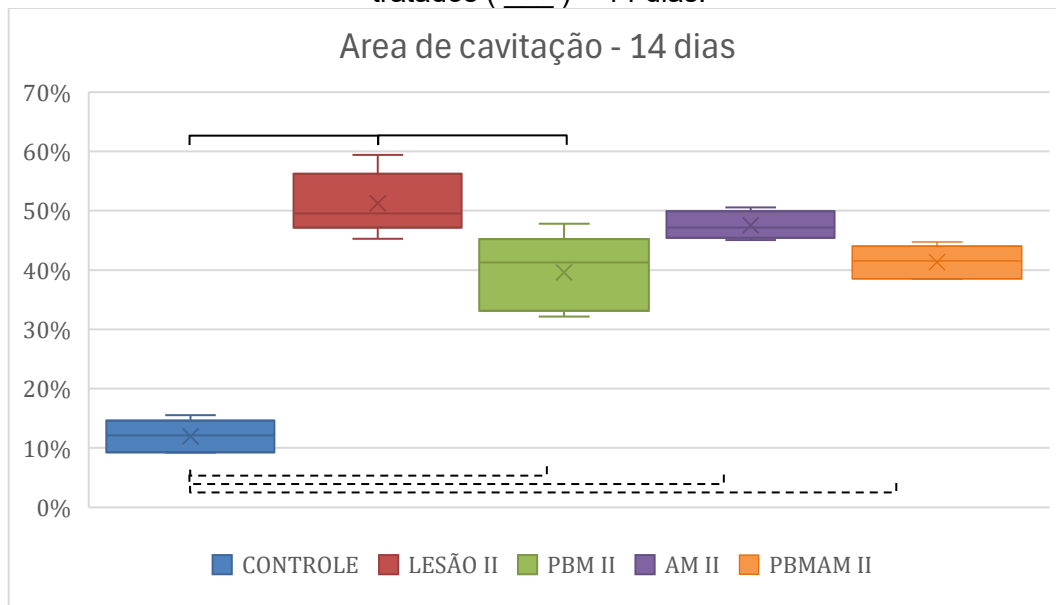
A seguir, apresentam-se os resultados da análise quantitativa obtidos a partir das imagens processadas pelo software ImageJ. Os valores foram submetidos aos cálculos estatísticos utilizando o Google Colab, e os gráficos correspondentes (Figura 17) foram gerados no Microsoft Excel.

A aplicação do teste de Tukey (Tabela 3) nos dados quantitativos obtidos evidenciou diferença estatisticamente significativa entre os grupos C e LII (C x LII), demonstrando que foram observadas alterações compatíveis com o quadro esperado após a lesão medular, em contraste com a integridade observada no grupo C.

A análise também demonstrou que todos os grupos submetidos à tratamento, apresentaram diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo Controle, indicando que nenhum dos tratamentos foi capaz de restabelecer padrões histológicos semelhantes ao tecido íntegro nesse período experimental.

Quando comparados ao grupo Lesão (LII), observou-se diferença estatisticamente significativa apenas para o grupo submetido à fotobiomodulação isolada (PBM II). Por outro lado, os grupos tratados com membrana amniótica isolada (MA II) e com a associação entre fotobiomodulação e membrana amniótica (PBM+AM II) não apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo LII. Adicionalmente, a comparação entre os grupos tratados não revelou diferenças estatisticamente significativas, sugerindo que, do ponto de vista histológico, nenhum protocolo terapêutico apresentou superioridade em relação aos demais no período avaliado.

Figura 17- Gráfico comparativo da porcentagem das áreas de cavitação em cada grupo com indicativo de significância estatística entre os grupos controle e tratados (_ _ _) e lesão e tratados (_ _) – 14 dias.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 3- Análise Estatística das Diferenças entre os Grupos C, I, PBM, AM E PBM+AM (14 dias) por Meio do Teste de Comparações Múltiplas de Tukey, Evidenciando as Relações Significativas entre os Tratamentos

group1	group2	meandiff	p-adj	lower	upper	reject
Controle	L II	39.29	0.0000	28.7458	49.8342	VERDADEIRO
Controle	MA II	35.59	0.0000	25.0458	46.1342	VERDADEIRO
Controle	PBM + MA II	29.362	0.0000	18.8178	39.9062	VERDADEIRO
Controle	PBM II	27.628	0.0000	17.0838	38.1722	VERDADEIRO
L II	MA II	-3.7	0.9604	-14.2442	6.8442	FALSO
L II	PBM + MA II	-9.928	0.0783	-20.4722	0.6162	FALSO
L II	PBM II	-11.662	0.0209	-22.2062	-1.1178	VERDADEIRO
MA II	PBM + MA II	-6.228	0.5873	-16.7722	4.3162	FALSO
MA II	PBM II	-7.962	0.2704	-18.5062	2.5822	FALSO
PBM + MA II	PBM II	-1.734	0.9998	-12.2782	8.8102	FALSO

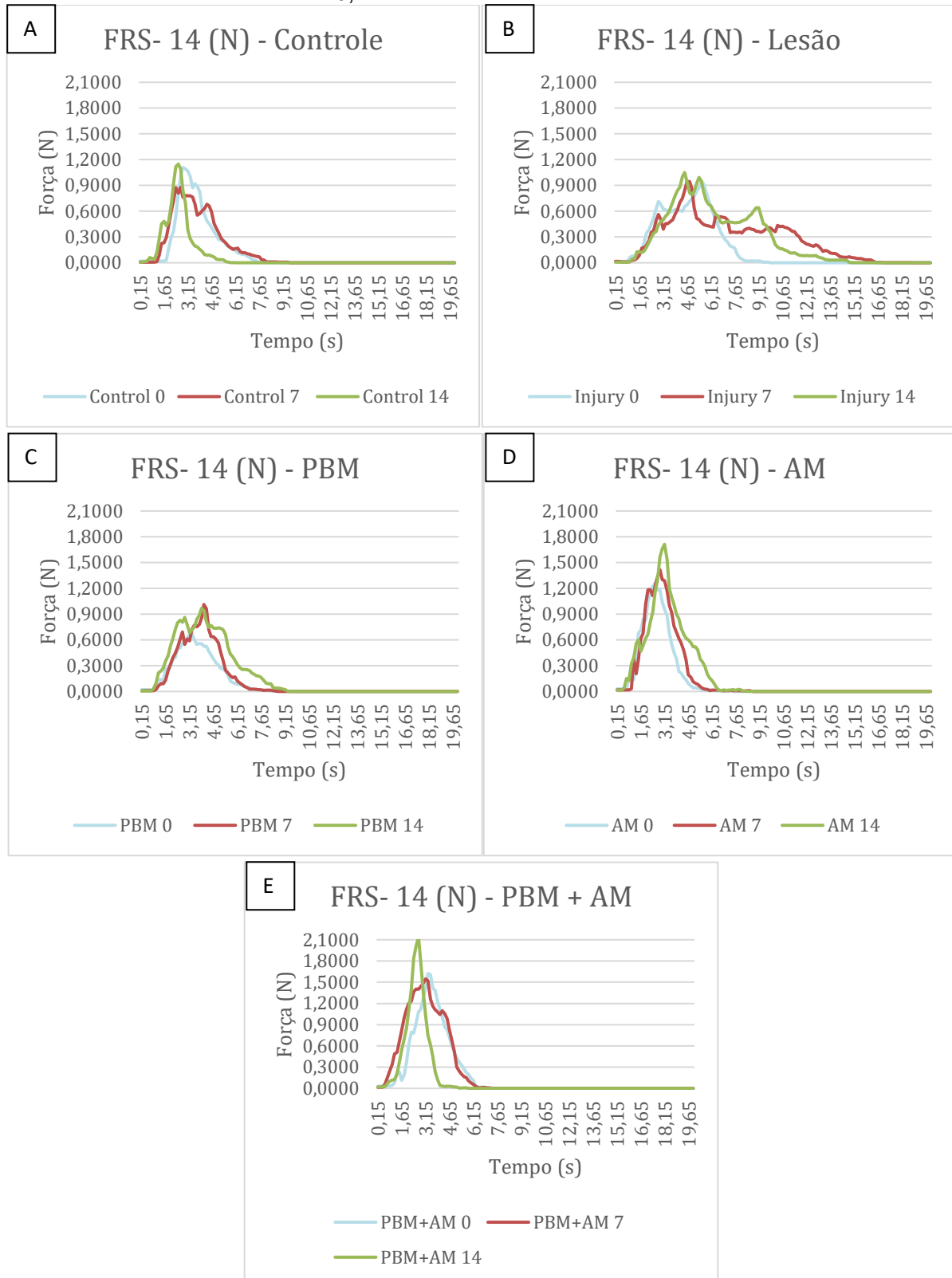
Fonte: Elaborado pelo autor.

7.2.3 Análise de Movimento

A figura 18 (A, B, C, D e E) apresenta os gráficos de distribuição da força, em Newtons (eixo y), ao longo do tempo, em segundos (eixo x) para o tempo experimental de 14 dias. Cada curva corresponde aos valores médios obtidos em cada um dos cinco grupos experimentais (C, L, PBM, AM e PBM+AM), em diferentes momentos:

dia 0 (linha azul), aos 7 (linha vermelha) e 14 (linha verde) dias após LM, permitindo interpretar que cada pico representa fases distintas do contato da pata do animal com o solo.

Figura 18 - Gráficos de Força de reação de solo dos grupos C, L II, AM II, PBM II e PBM + AM II eutanasiados 14 dias pós LM, em Newtons (N), apresentando os dados de coletados aos 0, 7 e 14 dias de análise de FRS



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 19- Análise estatística dos valores de significância (p-valor) das comparações entre grupos na avaliação biomecânica (FRS) aos 14 dias.

	C x L	C x PBM	C x AM	C x PBM+AM	L x PBM	L x AM	L x PBM+AM	PBM x AM	PBM x PBM+AM	AM x PBM+AM
Dia 7	0.001	N/A	0.005	N/A	0.010	0.001	N/A	0.005	N/A	N/A
Dia 14	0.001	0.002	0.006	N/A	0.001	0.020	0.001	N/A	0.014	0.003

Fonte: Elaborado pelo autor.

A análise estatística dos dados obtidos aos 14 dias (Figura 19) confirmou a consolidação da recuperação funcional nesse período experimental. A diferença entre os Grupos C e L manteve-se altamente significativa ($p=0,001$), confirmando que não houve recuperação espontânea completa da função locomotora nos animais não tratados ao final de duas semanas.

Ao comparar a eficácia dos tratamentos em relação ao Grupo Lesão, o grupo PBM apresentou diferença robusta ($p=0,001$), demonstrando consistência na manutenção da recuperação funcional, o mesmo sendo observado no grupo PBM+AM ($p=0,001$). Por sua vez, o grupo AM, embora ainda apresentasse diferença significativa em relação ao grupo L ($p=0,020$), demonstrou menor magnitude estatística quando comparado aos demais tratamentos.

A análise comparativa entre os grupos tratados aos 14 dias reforçou a superioridade do protocolo de fototerapia isolada. A diferença entre os grupos PBMII e AMII tornou-se extremamente acentuada ($p<0,001$). De forma relevante, verificou-se também diferença estatisticamente significativa entre os grupos PBMII e PBM+AMII ($p=0,014$). Esse dado indica que, a longo prazo, a adição da membrana amniótica ao protocolo de laser resultou em um desfecho biomecânico distinto e inferior ao obtido pela fotobiomodulação isolada, sugerindo que a terapia combinada não promoveu sinergismo funcional neste modelo experimental.

Embora as análises estatísticas da Força de Reação do Solo tenham apresentado alta sensibilidade para detectar diferenças biomecânicas entre os grupos experimentais, esses resultados devem ser interpretados com cautela quando considerados sob a perspectiva clínica. A plataforma de FRS fornece medidas objetivas e reproduzíveis da interação entre o membro posterior e o solo, sendo especialmente útil para identificar alterações sutis no padrão da marcha. No entanto, esses parâmetros descrevem o desempenho biomecânico global e não refletem

plenamente aspectos clínicos individuais, como estratégias compensatórias, adaptação comportamental e variabilidade entre os animais.

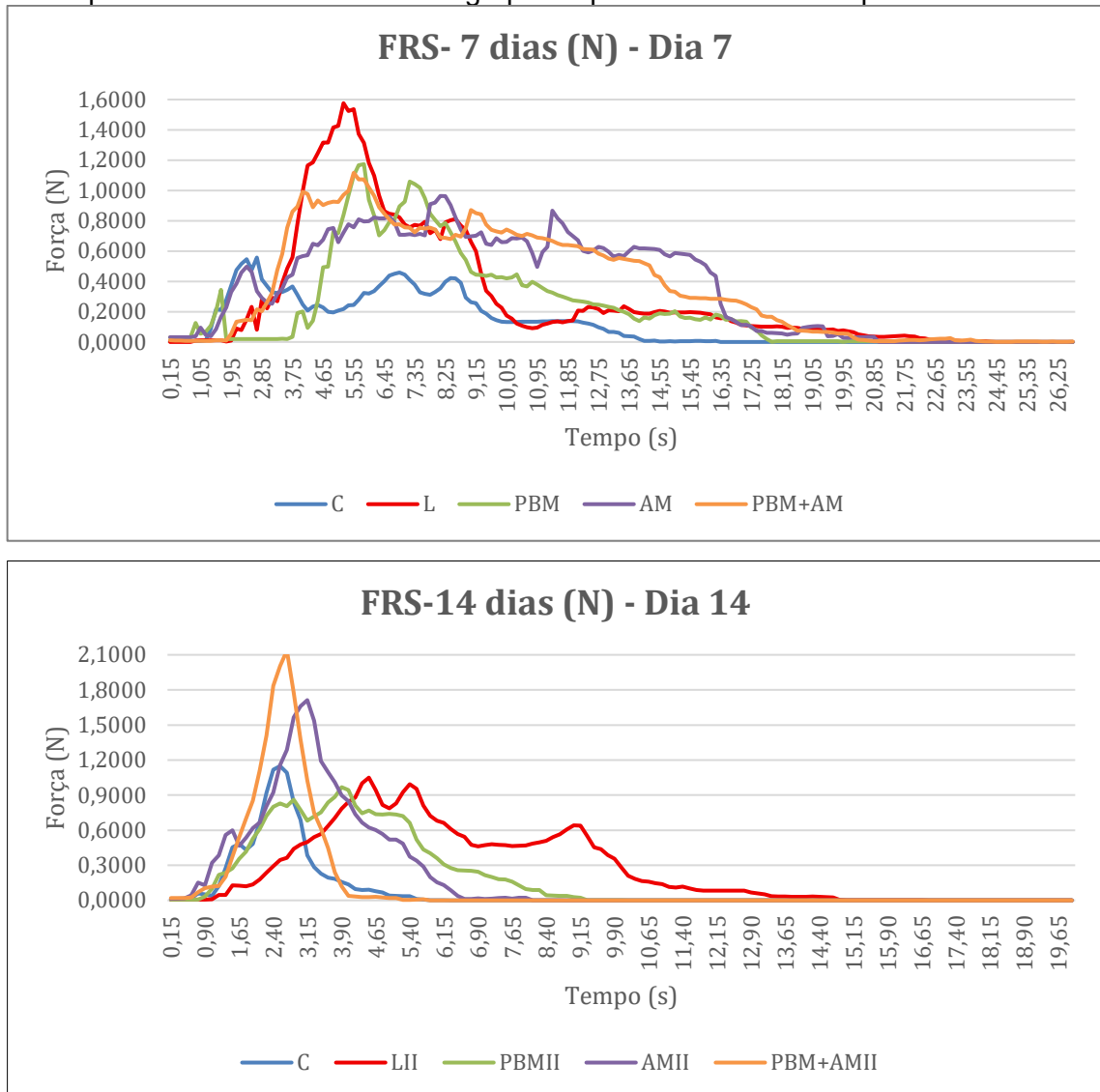
Assim, os resultados obtidos são altamente válidos para comparações entre grupos e para a análise da evolução funcional ao longo do tempo no contexto experimental, mas não devem ser interpretados como equivalentes diretos de desfechos clínicos individuais.

A Força de Reação do Solo (FRS) durante a marcha pode ser representada graficamente como a relação entre a magnitude da força aplicada pelo membro posterior e o tempo de contato com o solo ao longo da passada. Em animais saudáveis, essa relação assume uma morfologia semelhante a uma curva de distribuição normal (gaussiana), caracterizada por um pico de força bem definido, correspondente às fases de sustentação e propulsão, seguido por declínio rápido. Nesse contexto biomecânico, a eficiência do movimento é determinada pela capacidade de aplicar maior carga em menor intervalo de tempo, refletindo força muscular adequada e controle motor eficiente.

Os gráficos apresentados na figura 20 correspondem ao compilado de dados de todos os grupos experimentais ao final de cada período avaliado, 7 e 14 dias, permitindo a visualização comparativa do padrão global da marcha. A análise concentra-se, portanto, não em flutuações pontuais da curva, mas no traçado geral, particularmente na altura (carga aplicada) e na largura da base (tempo de contato com o solo). Distribuições semelhantes entre os grupos indicam correlação consistente entre força aplicada e tempo de deslocamento, enquanto desvios da forma gaussiana ideal, como picos irregulares ou declínios abruptos, devem ser interpretados, predominantemente, como variações comportamentais inerentes à experimentação animal, e não necessariamente como falha do protocolo terapêutico.

Assim, a interpretação funcional da FRS fundamenta-se no princípio de que quanto maior a carga aplicada em menor tempo, mais eficiente é o padrão de marcha, sendo a aproximação da curva gaussiana ideal indicativa de melhor integridade funcional da medula espinhal.

Figura 20- Representação da Força de Reação do Solo (FRS) durante a marcha dos animais nos períodos de 7 e 14 dias após a lesão medular. Os gráficos apresentam a distribuição da força aplicada ao solo em função do tempo de contato do membro posterior, compilando os dados de todos os grupos experimentais em cada período avaliado.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A análise dos gráficos da Força de Reação do Solo (FRS) no período agudo, 7 dias pós-lesão, evidenciou alterações marcantes no padrão da marcha dos animais do grupo Lesão. Observou-se que esses animais aplicaram maior quantidade de força ao solo distribuída em um intervalo de tempo prolongado, resultando em curvas com grande amplitude e base alargada. Esse comportamento indica instabilidade locomotora característica da fase aguda da lesão medular, associada à dificuldade de finalizar a passada de forma eficiente, com manutenção prolongada da pata em contato com o solo.

Em contraste, os grupos submetidos aos protocolos terapêuticos apresentaram redução da amplitude e do tempo de aplicação da força, aproximando-se do padrão observado no grupo Controle. Dentre os tratamentos avaliados, o grupo submetido à fotobiomodulação isolada (PBM) apresentou maior proximidade ao comportamento biomecânico normal, seguido pelos grupos PBM+AM e AM. Dessa forma, considerando a eficiência da marcha avaliada pela relação entre carga aplicada e tempo de contato com o solo, os grupos puderam ser organizados na seguinte ordem decrescente de desempenho funcional: Controle > PBM > PBM+AM > AM > Lesão.

Na análise dos gráficos da Força de Reação do Solo (FRS) aos 14 dias após a lesão, correspondente ao período de cronificação, observou-se modificação no padrão biomecânico da marcha dos animais do grupo LII. Embora a instabilidade locomotora tenha sido mantida ao longo de todo o percurso na plataforma, esses animais passaram a aplicar menor magnitude de força ao solo quando comparados ao período agudo de 7 dias, resultando em curvas achatadas, indicativas de fraqueza muscular e redução da capacidade de propulsão. Em relação aos grupos tratados, verificou-se que o grupo PBM+AMII apresentou comportamento gráfico mais próximo ao grupo Controle, caracterizado pela restauração da altura da curva de força sem aumento do tempo de contato com o solo. A distribuição da FRS nesse grupo mostrou-se semelhante à do padrão fisiológico, sugerindo maior eficiência da marcha. Os grupos PBMII e AMII apresentaram padrões intermediários, enquanto o grupo LII manteve o pior desempenho funcional. Assim, os grupos puderam ser ordenados da seguinte forma, do melhor para o pior desempenho biomecânico: Controle > PBM+AMII > AMII > PBMII > LII.

8 DISCUSSÃO

A Lesão Medular (LM) permanece como uma das condições neurológicas mais devastadoras e desafiadoras da medicina contemporânea, não apenas em função de sua complexidade fisiopatológica, mas também pelo expressivo impacto socioeconômico e na qualidade de vida dos indivíduos acometidos. A LM afeta predominantemente adultos jovens em idade produtiva, com prevalência no sexo masculino, que representa cerca de 78% dos novos casos anuais, sendo os traumas, especialmente acidentes automobilísticos e quedas, a principal etiologia, refletindo a elevada vulnerabilidade da coluna vertebral a impactos de alta energia (Ahuja *et al.*, 2017a; Falavigna *et al.*, 2013; NSCISC, 2018; 2024; Silva *et al.*, 2014).

Além das perdas motoras e sensitivas, a LM impõe um ônus financeiro substancial. Os custos diretos e indiretos associados a procedimentos cirúrgicos, hospitalizações prolongadas, reabilitação contínua e perda de produtividade podem alcançar valores milionários ao longo da vida de um único paciente, o que torna imperativa a busca por estratégias terapêuticas capazes de, não apenas estabilizar o quadro clínico, mas também promover a recuperação funcional efetiva, aliando eficácia clínica à viabilidade econômica para os sistemas de saúde (Ahuja *et al.*, 2017a, 2017b; NSCISC, 2018).

A pesquisa por terapias eficazes para o tratamento da LM decorre, em grande parte, da dificuldade intrínseca de regeneração dos componentes do Sistema Nervoso Central (SNC) e da escassez de avanços clínicos definitivos. A compreensão aprofundada da fisiopatologia da LM é essencial para contextualizar os efeitos terapêuticos observados, uma vez que o evento traumático desencadeia um processo bifásico composto por uma lesão primária, resultante do impacto mecânico imediato, que ocasiona destruição neuronal, glial e ruptura da barreira hemato-medular, sendo em grande parte irreversível. A lesão secundária, que se inicia minutos após o trauma, pode persistir por semanas ou meses, dependendo de fatores como intensidade e nível anatômico, entre outros, exacerbando o dano tecidual por uma complexa cascata de eventos bioquímicos e celulares (Ahuja *et al.*, 2017b; Anjum *et al.*, 2020; Oyinbo, 2011; Rowland *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2014; Tator, 1995).

Para fins de estratificação terapêutica, a lesão secundária é classicamente dividida em fases aguda, subaguda, intermediária e crônica, cada uma apresentando desafios biológicos distintos e janelas específicas de intervenção (Ahuja *et al.*, 2017b).

Nesse contexto, a lesão secundária é caracterizada por isquemia, edema, excitotoxicidade e resposta inflamatória exacerbada, constituindo um alvo central para intervenções terapêuticas, por oferecer uma potencial janela para a modulação do ambiente da lesão medular (Anjum *et al.*, 2020; Byrnes *et al.*, 2005; Carvalho *et al.*, 2016; Giacci *et al.*, 2014; Paula, 2011; Silva *et al.*, 2014; Veronez *et al.*, 2017). A escassez de estratégias eficazes motivou o presente estudo, que combinou avaliações histomorfológicas e funcionais, em tempos experimentais definidos, com a integração da análise do processo de reparo tecidual à análise da função locomotora após LM.

Inserida nesse cenário, a Fotobiomodulação (FBM) emerge como uma estratégia terapêutica promissora, especialmente por atender aos critérios de baixo custo, segurança e elevada acessibilidade. É uma terapia não invasiva, atérmica e com perfil favorável de segurança quando comparada a abordagens farmacológicas sistêmicas, as quais frequentemente estão associadas a efeitos adversos significativos (Glass, 2021). Além disso, equipamentos baseados em Laser ou LED apresentam longa vida útil e capacidade de atendimento a grande número de pacientes, otimizando recursos em centros de reabilitação. Entretanto, a eficácia da FBM depende da definição criteriosa dos parâmetros dosimétricos, como comprimento de onda, energia e irradiância, os quais devem ser adequados ao tecido alvo e respeitar a janela terapêutica, a fim de evitar respostas inibitórias ou ineficazes (Hamblin, 2016; 2017; 2018). Nesse sentido, os dados obtidos neste estudo indicam que as terapias propostas foram capazes de modular o microambiente tecidual na área da lesão de forma distinta e complementar ao longo do tempo.

A aplicação da FBM em tecido nervoso é respaldada por estudos seminais, como os de Hamblin (2016), que demonstrou a capacidade de penetração transcraniana da luz no infravermelho próximo, modulando a atividade cerebral em casos de Traumatismo Cranioencefálico (TCE) e doenças neurodegenerativas. O autor relata que a FBM transcraniana reduz a neuroinflamação e previne a apoptose de neurônios, sugerindo que mecanismos similares de neuroproteção mitocondrial podem ser extrapolados para o tratamento da medula espinhal lesionada, na qual a barreira óptica, como vértebras e tecido muscular, constitui um desafio superável com parâmetros adequados (Hamblin, 2016; 2018).

Concomitantemente, a Membrana Amniótica Humana (MA) consolida-se como um biomaterial de excelência para a medicina regenerativa. Sua disponibilidade é

praticamente ilimitada, uma vez que é obtida da placenta, um anexo fetal normalmente descartado após o parto, o que elimina conflitos éticos e reduz drasticamente os custos de obtenção (Mamede *et al.*, 2012; Sant'Anna *et al.*, 2011). Diferente de terapias que utilizam células-tronco isoladas ou em cultura, que envolvem processos que exigem laboratórios de alta tecnologia, manipulação extensiva, custos elevados e riscos de baixa viabilidade ou de rejeição após o transplante (Elkhenany *et al.*, 2022; Mamede *et al.*, 2012; Munoz-Torres *et al.*, 2023), o uso da MA como fragmento (patch) preserva o nicho biológico nativo.

A aplicação do fragmento da MA mantém a integridade da matriz extracelular e do "coquetel" de fatores de crescimento e citocinas imunomoduladoras presentes no estroma e epitélio, oferecendo um *scaffold* natural que protege a lesão e modula o microambiente inflamatório (Fénelon *et al.*, 2021; Nicodemo *et al.*, 2017). No entanto, a otimização da aplicação é fundamental. Estudos prévios realizados por nosso grupo de pesquisa indicam que, preferencialmente, a membrana amniótica deve ser posicionada com a face mesenquimal em contato direto com a área da lesão, visando maximizar a liberação de fatores tróficos e a integração tecidual (Nicodemo *et al.*, 2024; Sant'Anna *et al.*, 2011).

O ineditismo e a relevância científica desta tese residem na proposta de associar esses dois protocolos terapêuticos (FBM e MA) especificamente no tratamento de lesões traumáticas no Sistema Nervoso Central (SNC).

Embora a literatura apresente evidências do uso dessas terapias em lesões do Sistema Nervoso Periférico (SNP), como em nervo ciático e tendões, onde as células de *Schwann* desempenham papel central e facilitador na regeneração (Chang *et al.*, 2026; Nicodemo *et al.*, 2017), o desafio no SNC é substancialmente maior. Na medula espinhal, a presença de oligodendrócitos, astrócitos reativos e um ambiente inibitório à regeneração axonal pós-lesão dificultam a recuperação espontânea. Portanto, investigar se a sinergia entre a bioenergética fornecida pela FBM e o suporte matricial e trófico da MA podem superar essas barreiras no SNC constitui uma fronteira inovadora na pesquisa translacional.

Os resultados deste estudo demonstraram o potencial terapêutico dos protocolos de tratamento com FBM e AM, isolados ou associados, na redução da progressão do processo de necrose tecidual, com consequente preservação dos componentes teciduais da medula espinhal após lesão medular induzida experimentalmente. As intervenções resultaram em benefícios estruturais relevantes,

reforçando o potencial dessas abordagens como estratégias neuroprotetoras em lesões traumáticas que acometem esse tecido. Os achados indicam preservação significativa dos componentes neurais e gliais, sugerindo efeito protetor contra a progressão da degeneração secundária, reforçados pelos resultados da análise biomecânica da força de reação do solo (FRS).

Neste estudo pré-clínico avaliamos qualitativa e quantitativamente terapias promissoras para o tratamento de LM com a aplicação de FBM, MA e sua associação. A correlação entre as características microscópicas das células e fibras do tecido nervoso, após lesão medular, com os parâmetros funcionais de locomoção, por meio da análise biomecânica, revelou efeitos positivos após o tratamento com AM, PBM e PBM+AM em comparação ao grupo não tratado, em dois períodos específicos, 7 dias (aguda e subaguda) e 14 dias (intermediária).

A análise histopatológica é considerada “padrão-ouro” na avaliação do reparo tecidual, pois permite a observação microscópica detalhada das alterações celulares e estruturais. A avaliação histológica, utilizando as colorações com H&E e LFB, forneceu relevantes informações sobre a crítica fase inicial de reparo do tecido nervoso após LM, considerando que a extensão da área da lesão pode definir danos funcionais permanentes, com consideráveis prejuízos à qualidade de vida do indivíduo.

O grupo Controle, submetido a procedimentos cirúrgicos sem indução de lesão medular, exibiu as características histológicas de tecido nervoso saudável (Montine; Dintzis; Treuting, 2018). Distintamente, grandes áreas de cavitação circundadas por células gliais foram observadas no Grupo L, revelando que a lesão medular induziu intensa resposta inflamatória, seguida dos processos de degeneração celular e necrose tecidual consequentes à LM.

Os resultados obtidos podem ser explicados considerando a composição do tecido nervoso da medula espinhal, que inclui projeções neuronais, conhecidas como axônios recobertos pela proteína mielina, estruturas essenciais para a condução dos impulsos nervosos (Fan *et al.*, 2018). Após lesão medular (LM), a degradação enzimática, decorrente da liberação de lisossomos das células destruídas, desencadeia a formação de áreas de cavitação, caracterizadas por espaços frequentemente preenchidos por conteúdo fluido e circundados por células gliais, especialmente astrócitos reativos e micróglia ativada, estas últimas classificadas

como células imunes residentes do sistema nervoso central (Fleming *et al.*, 2006; O'Shea; Burda; Sofroniew, 2017).

A resposta inflamatória associada à LM é marcada pelo aumento e ativação das células gliais, em particular da micróglia, responsável pela remoção de células necróticas e fibras nervosas danificadas por meio da fagocitose. Em lesões mais graves, quando há comprometimento da barreira hematoencefálica, ocorre ainda o recrutamento e infiltração de células imunes periféricas, como macrófagos oriundos da corrente sanguínea, os quais são guiados até o local da lesão por enzimas liberadas pelas células destruídas e pela produção e liberação de mediadores inflamatórios (Ahuja *et al.*, 2017a, 2017b; Chedly *et al.*, 2017; Giacci *et al.*, 2014; Song *et al.*, 2017). O desenvolvimento dessas regiões de cavitação contribui diretamente para a perda das funções sensoriais e motoras, muitas vezes de caráter permanente e irreversível (Zhang *et al.*, 2020).

O modelo de LM, por contusão, levou à perda da função motora e sensorial abaixo do local da lesão, conforme observado na análise FRS, permitindo a comparação das características histológicas envolvidas no reparo do tecido nervoso central ao desempenho cinemático do animal, em tempos experimentais pré-definidos.

Diversos estudos relataram a aplicação da PBM em processos de reparo tecidual, em diferentes tecidos, utilizando parâmetros e protocolos distintos (Chang; Lee, 2023; Naeser; Hamblin, 2015; Santos *et al.*, 2021; Wu *et al.*, 2009; Zein; Selting; Hamblin, 2018). A eficácia dessa terapia depende do ajuste cuidadoso de seus parâmetros para atender às características anatômicas e fisiopatológicas da condição a ser tratada. Isso inclui não apenas a configuração do dispositivo, mas também a estratégia terapêutica utilizada. Para alcançar os resultados clínicos desejados, é essencial considerar tanto o tecido-alvo quanto a etiologia subjacente. Parâmetros-chave como profundidade anatômica do tecido, comprimento de onda ideal para penetração adequada, duração da exposição e método de aplicação devem ser ajustados adequadamente para maximizar os efeitos terapêuticos da FBM (Hamblin, 2016; 2017; Mosca, 2019; Veronez *et al.*, 2017). A FBM, operando em uma faixa de comprimento de onda entre 750 e 1000 nm, apresentou melhor resultado em tecidos mais profundos devido à sua capacidade de penetração (Correia *et al.*, 2025a; Giacci *et al.*, 2014; Song *et al.*, 2017; Veronez *et al.*, 2017). No presente estudo, foi utilizado

o comprimento de onda de 808 nm e potência radiante de 100 mW, capaz de penetrar nos tecidos mais profundos e atingir o tecido medular.

Teoricamente, a energia da FBM, absorvida pelas mitocôndrias de células viáveis, pode ser responsável pela preservação das células e fibras nervosas na área da LM, estimulando a divisão de células gliais e manutenção de neurônios viáveis, segundo relato de estudos publicados (Karu, 1989; Li *et al.*, 2023; Pedram *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2020). O menor número e o tamanho reduzido das áreas de cavitação presentes no grupo PBM, em comparação aos aspectos histológicos do grupo L, sugerem que as células viáveis foram capazes de absorver a energia fornecida pela fototerapia, mantendo sua integridade e funcionalidade, considerando a recuperação dos movimentos, detectados pela análise cinemática, 7 dias pós-LM. Dessa forma, a FBM mostrou-se eficaz em atenuar a deterioração funcional progressiva observada no Grupo L, tanto qualitativa quanto quantitativamente, favorecendo a recuperação locomotora que mais se aproximou ao observado no grupo Controle.

A membrana amniótica humana é um tecido biocompatível e imunologicamente privilegiado, com propriedades anti-inflamatórias, antifibróticas, antimicrobianas e antimutagênicas bem documentadas (Fénelon *et al.*, 2021). Além disso, a aplicação da MA facilita a angiogênese e reduz o estresse oxidativo (Hu *et al.*, 2023b), com capacidade de aderir às lesões teciduais, mantendo um microambiente úmido no local da lesão e integrando-se aos tecidos ao redor da área de aplicação (Sarvari *et al.*, 2022). A aplicação desse biomaterial, com a face mesenquimal voltada para a região da LM, seguiu a descrição de estudos anteriores que relataram resultados expressivos quando o lado mesenquimal contactava a região de interesse (Arisawa *et al.*, 2017; Carvalho *et al.*, 2016; Mamede; Sant'Anna, 2019; Nicodemo *et al.*, 2024; Oliveira *et al.*, 2017). Estudo desenvolvido por Nicodemo *et al.* (2024), com aplicação de fragmentos de MA em lesões tendíneas induzidas, revelou que, 3 dias após a aplicação desse biomaterial, foi possível visualizar sua adesão à superfície do tecido tendíneo. Aos 28 dias, o fragmento de MA estava totalmente integrado ao tecido, que se apresentava na fase final de regeneração tecidual.

Os resultados aqui obtidos permitiram verificar uma correlação direta entre a preservação histológica e o desempenho funcional 7 dias pós-LM, gerando a seguinte classificação em relação à eficácia dos protocolos aplicados: Controle > PBM > PBM+AM > AM > Lesão. Nesta fase inicial do processo, destacam-se os resultados do grupo PBM, aplicado como monoterapia, corroborando o descrito na literatura que

propõe a fotobiomodulação como ferramenta terapêutica eficaz na modulação da resposta inflamatória aguda.

A energia da FBM, absorvida pelas mitocôndrias de células viáveis, atua na redução da expressão de citocinas pró-inflamatórias, como TNF-, IL-1, iNOS, e na regulação do estresse oxidativo (Hamblin, 2017). O menor número e o tamanho reduzido das áreas de cavitação no grupo PBM aos 7 dias, em comparação ao grupo L, sugerem que essa terapia limitou a expansão da área de necrose secundária. Este efeito de contenção do dano inflamatório inicial refletiu-se diretamente na função: a FBM atenuou a deterioração funcional progressiva observada no grupo não tratado, favorecendo a recuperação da força de reação do solo (FRS) com valores mais próximos aos padrões do grupo C, conforme observado também em estudos recentes que correlacionam a modulação inflamatória precoce com melhores desfechos motores (Beloni *et al.*, 2025a; 2025b).

A Membrana Amniótica (MA), embora eficaz em relação ao grupo L, apresentou resultados inferiores ao grupo PBM nessa fase aguda, que podem ser justificados pela interação biológica entre tecidos. Enquanto a FBM atua de forma imediata na bioenergética celular e na modulação de mediadores inflamatórios, a MA funciona como um curativo biológico que, além de proteger a área da lesão contra invasão de células ou agentes estranhos ao tecido medular, libera gradualmente fatores tróficos e anti-inflamatórios (Mamede; Sant'Anna, 2019; Nicodemo *et al.*, 2017). Aos 7 dias, o processo de integração do biomaterial ainda está em curso, o que pode justificar o impacto ligeiramente menor na avaliação funcional, em comparação à resposta rápida induzida pela luz.

Aos 14 dias, os resultados apresentaram uma inversão notável. Enquanto a análise histológica apontou a PBM isolada como o único tratamento a manter significância estatística na redução da área de cavitação em relação ao grupo lesão, a análise funcional (FRS) revelou que o grupo PBM+AMII obteve o melhor desempenho biomecânico, considerando a classificação em ordem decrescente: Controle > PBM+AMII > AMII > PBMII > LesãoII. A aparente discrepância entre a ausência de significância estatística na redução da área de cavitação nos grupos tratados com a membrana amniótica, isoladamente ou em associação à FBM (AMII e PBM+AMII), e o desempenho funcional superior observado nos animais desses grupos pode ser atribuído ao mecanismo mais lento de integração desse biomaterial com os tecidos, anteriormente relatado.

Diferente da FBM, que atua modulando a inflamação e resultando em cicatrizes reduzidas, a MA atua fisicamente como um *scaffold* biodegradável rico em colágeno e laminina (Arrizabalaga; Nollert, 2018; Fénelon *et al.*, 2021).

No presente estudo, foi possível observar na análise histológica qualitativa que, aos 14 dias, a membrana amniótica encontrava-se em processo ativo de integração e remodelação, servindo como substrato para a migração celular e preenchimento da lesão. Na análise morfométrica, a área ocupada por este arcabouço em remodelação e pelo influxo celular regenerativo pode ser contabilizada como "tecido não-neural" ou área de lesão, mantendo as dimensões da cavidade estatisticamente semelhantes ao grupo lesão. No entanto, biologicamente, trata-se de uma área preenchida por matriz bioativa, diferindo fundamentalmente do cisto necrótico vazio observado no grupo não tratado.

O resultado funcional superior do grupo PBM+AMII indica possível efeito sinérgico, onde a FBM forneceria o suporte bioenergético necessário para as células que colonizaram o arcabouço estrutural proporcionado pela membrana amniótica. Dessa forma, a MA forneceu o suporte físico e os fatores neurotróficos para guiar a proliferação celular e a FBM otimizou o metabolismo dessas células e modulou o ambiente inflamatório (Chang; Lee, 2023; Zhang *et al.*, 2020). A recuperação da biomecânica da marcha, com melhor distribuição de força e tempo de apoio, indica que essa combinação favoreceu a plasticidade dos circuitos espinhais, possibilitando reorganização funcional mais eficiente em comparação à preservação tecidual proporcionada pelo laser.

Nossos achados histológicos e biomecânicos reforçam que a aplicação da FBM reduziu a resposta inflamatória aguda, limitando a expansão da necrose no tecido nervoso central e diminuindo a formação da cicatriz glial. O uso da FBM, ferramenta terapêutica de custo relativamente reduzido, não invasiva e sem efeitos colaterais, apresentou resultados consistentes na preservação da integridade tecidual, corroborando dados prévios sobre sua eficácia na fase aguda (Paula *et al.*, 2014; Veronez *et al.*, 2017).

Concomitantemente, a MA confirmou seu papel como biomaterial imunologicamente privilegiado e biocompatível. Sua aplicação com a face mesenquimal voltada para a lesão, conforme protocolos estabelecidos (Nicodemo *et al.*, 2024), facilitou a integração tecidual e promoveu um ambiente favorável à recuperação funcional tardia. A ausência de rejeição e a redução do infiltrado

inflamatório crônico nos grupos com MA corroboram seu potencial anti-inflamatório e antifibrótico (Mamede; Sant'Anna, 2019).

Em síntese, os dados indicam que a FBM é superior na contenção do dano agudo (7 dias), enquanto a presença da Membrana Amniótica parece crucial para sustentar a recuperação funcional na fase subaguda (14 dias). A associação PBM+AM demonstrou ser a estratégia mais promissora a longo prazo, unindo a modulação inflamatória da luz com o suporte regenerativo da membrana. Estes resultados sustentam o potencial de aplicação clínica destas terapias, evidenciando o papel da MA como um *scaffold* bioativo facilitador da neuroplasticidade, potencializado pela energia fornecida pela FBM.

Nessa perspectiva, os achados histológicos e biomecânicos deste estudo materializam experimentalmente os complexos mecanismos da fisiopatologia da lesão medular revisados recentemente por Hu *et al.* (2023a). A extensa cavitação cística e a degradação da substância branca observadas no grupo Lesão sem tratamento, correspondem macroscopicamente à cascata de eventos da lesão secundária descrita na literatura, onde a excitotoxicidade, a isquemia e a resposta inflamatória exacerbada, mediada por micróglia e macrófagos neurotóxicos, conduzem à necrose tecidual progressiva e à formação de barreiras físicas à regeneração. A persistência desses danos estruturais correlacionou-se diretamente com o déficit funcional sustentado observado na análise de Força de Reação do Solo (FRS) neste grupo.

Neste contexto, a superioridade da Fotobiomodulação na fase aguda (7 dias), tanto na preservação da área tecidual quanto na recuperação da FRS, valida o conceito de "regulação física" do microambiente imune. Conforme detalhado por (Hu *et al.*, 2023a), a terapia por luz atua inibindo a ativação de astrócitos e micróglia neurotóxicas e polarizando macrófagos para o fenotipo reparador (M2) por vias de sinalização como NF- κ B e MAPK. Nossos dados sugerem que a PBM atuou efetivamente dentro dessa janela de oportunidade crítica, mitigando a tempestade de citocinas inicial e preservando a bioenergética mitocondrial necessária para a sobrevivência celular, o que se traduziu na manutenção precoce da locomoção observada.

Por outro lado, a inversão de resultados observada aos 14 dias, onde a associação PBM+AM demonstrou o melhor desempenho funcional, destaca a complementaridade necessária entre imunomodulação e suporte estrutural. Enquanto a PBM gerenciou a inflamação aguda, a Membrana Amniótica (MA) atuou como o

scaffold bioativo ideal descrito na revisão de Hu *et al.* (2023a), fornecendo uma matriz rica em colágeno e laminina para a migração celular e remodelação tecidual. A discrepância aparente entre a histologia (cavitação estatisticamente similar à lesão) e a excelente função no grupo PBM+AM aos 14 dias sugere que a área da lesão estava sendo remodelada e preenchida pela matriz integrada da MA, facilitando a plasticidade dos circuitos neurais e a reconexão funcional descrita como "remodelação de circuitos", em vez de permanecer como um cisto necrótico vazio.

A eficácia da terapia combinada observada neste estudo encontra respaldo na análise crítica realizada por Tobelem *et al.* (2022), que relataram que a associação da Fotobiomodulação com outras estratégias, como terapias celulares ou enzimas, a exemplo da condroitinase ABC, produz resultados superiores às intervenções isoladas, incluindo maior crescimento axonal e reorganização de neurofilamentos.

Além disso, ao compararmos o perfil de segurança, Tobelem *et al.* (2022) destacaram evidências de que a FBM pode alcançar recuperação motora e alívio da dor neuropática equiparáveis ao uso de corticosteroides, porém sem os graves efeitos adversos sistêmicos, como perda de peso e mortalidade, associados ao tratamento farmacológico tradicional. Esses dados reforçam a nossa hipótese de que a modulação do ambiente inflamatório via FBM, especialmente quando iniciada na fase aguda, cria um nicho regenerativo favorável, reduzindo a cavidade da lesão e potencializando a ação de biomateriais associados, sem os riscos da imunossupressão sistêmica (Tobelem *et al.*, 2022).

Em suma, esta tese fornece evidências *in vivo* de que a estratégia combinatória é superior para o desfecho a longo prazo, alinhando-se às perspectivas futuras apontadas por Hu *et al.* (2023a). A sinergia observada confirma que, para superar a complexidade da lesão medular, é necessário abordar simultaneamente a bioenergética celular (via PBM) e a reconstrução do microambiente físico (via MA), transformando um ambiente inibitório hostil em um nicho permissivo à neuroregeneração e à recuperação funcional sustentada.

Estudos futuros devem contemplar períodos experimentais mais longos e aumento do número amostral, a fim de avaliar a manutenção dos efeitos observados e sua possível influência na fase crônica da lesão medular, bem como investigar a translação desses protocolos combinados para o contexto clínico. Além disso, a incorporação de análises por imunohistoquímica permitirá a identificação precisa das populações celulares envolvidas na resposta aos protocolos de tratamento propostos,

incluindo a caracterização de marcadores inflamatórios, e células como astrócitos e micróglia, contribuindo para a elucidação dos mecanismos subjacentes aos efeitos terapêuticos observados.

9 CONCLUSÃO

Este estudo abordou a complexidade terapêutica das lesões medulares traumáticas, avaliando e comparando a eficácia da membrana amniótica humana (MA) e da fotobiomodulação (FBM), aplicadas de forma isolada ou associada, em um modelo experimental de contusão medular em ratos, integrando análises histológicas e avaliação biomecânica funcional nos períodos de 7 e 14 dias.

Histologicamente, a lesão medular não tratada resultou em necrose extensa e cavitação cística, enquanto todos os protocolos terapêuticos promoveram preservação da citoarquitetura medular em relação ao grupo lesão. Na fase aguda, 7 dias, a fotobiomodulação isolada destacou-se como a estratégia mais eficaz para contenção da área de cavitação. A recuperação funcional locomotora, detectada pela análise da Força de Reação do Solo, revelou que a fotobiomodulação isolada proporcionou o melhor desempenho biomecânico, aproximando-se dos padrões fisiológicos do grupo controle.

Aos 14 dias, nos grupos tratados com membrana amniótica observou-se preservação estrutural compatível com o efeito neuroprotetor continuado exercido pelo biomaterial. Em contraste, a associação das terapias FBM + MA revelou superioridade funcional significativa, indicando que essa combinação favorece uma recuperação motora mais sustentada.

Esses achados demonstram que a fotobiomodulação constitui uma estratégia eficaz para o manejo neuroprotetor imediato na fase aguda da lesão medular, enquanto sua associação com a membrana amniótica emerge como a abordagem mais promissora para a recuperação funcional a médio prazo. Do ponto de vista translacional, os resultados reforçam o potencial de terapias acessíveis e de baixo custo como alternativas viáveis para modificar positivamente o curso natural da lesão medular traumática.

REFERÊNCIAS

- AHUJA, Christopher S. *et al.* Traumatic spinal cord injury. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, 17018, 2017a.
- AHUJA, Christopher S. *et al.* Traumatic spinal cord injury - Repair and regeneration. **Clinical Neurosurgery**, v. 80, n. 3, p. S22–S90, 1 mar. 2017b.
- AL-HABIB, Amro *et al.* Effects of compressive lesions on intraoperative human spinal cord elasticity. **Journal of Neurosurgery: Spine**, v. 35, n. 6, p. 807–816, 1 dez. 2021.
- ALIZADEH, Arsalan; DYCK, Scott Matthew; KARIMI-ABDOLREZAEI, Soheila. Traumatic spinal cord injury: An overview of pathophysiology, models and acute injury mechanisms. **Frontiers in Neurology**, v. 10, 282, 2019.
- ALVES, P.C.S.; SANT'ANNA, L. B. Potencial Da Membrana Amniótica Humana Na Odontologia. *In: ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA*, 20., 2016. **Anais...** São José dos Campos: Univap, 2016, p. 1–6.
- ANCILLAO, Andrea *et al.* Indirect measurement of ground reaction forces and moments by means of wearable inertial sensors: A systematic review. **Sensors**, v. 18, n. 8, ago. 2018.
- ANDRAUS, Rodrigo Antônio Carvalho; BARBIERI, Cláudio Henrique; MAZZER, Nilton. A irradiação local com o laser de baixa potência acelera a regeneração do nervo fibular de ratos. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 18, n. 3, p. 152–157, 2010.
- ANJUM, Anam *et al.* Spinal cord injury: Pathophysiology, multimolecular interactions, and underlying recovery mechanisms. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 20, 2 out. 2020.
- ARISAWA, Emilia Angela LoSchiavo. Amniotic Membrane in the Treatment of Spinal Cord Injuries. **Biomedical Journal of Scientific & Technical Research**, v. 1, n. 5, 30 out. 2017.
- ARRIZABALAGA, Julien H.; NOLLERT, Matthias U. Human Amniotic Membrane: A Versatile Scaffold for Tissue Engineering. **ACS Biomaterials Science and Engineering**, v. 4, n. 7, p. 2226-2236, 2018.
- BAPTISTE, Darryl C.; FEHLINGS, Michael G. Update on the treatment of spinal cord injury. **Progress in Brain Research**, n. 161, p. 217-233, 2007.
- BELONI, Luis Filipe Karatanasov; *et al.* Kinematic and sensory-motor analysis of the effects of treatments with photobiomodulation in rats with experimentally induced spinal injury. **Lasers in Medical Science**, v. 40, n. 1, p. 134, 11 mar. 2025a.

BELONI, Luis Filipe Karatanasov *et al.* Biomechanical Analysis of Experimental Spinal Cord Injury Treated with Photobiomodulation. **SBEB Sociedade Brasileira de Engenharia Biomédica**, p. 329–339, 2025b.

BICAN, Orhan; MINAGAR, Alireza; PRUITT, Amy A. The Spinal Cord. A Review of Functional Neuroanatomy. **Neurologic Clinics**, v. 31, n. 1, p. 1-18, fev. 2013.

BURNS, Stephen *et al.* International Standards for Neurological Classification of Spinal Cord Injury, Revised 2011. **Topics in Spinal Cord Injury Rehabilitation**, v. 18, n. 1, p. 85–99, jan. 2012.

BYRNES, Kimberly R. *et al.* Light promotes regeneration and functional recovery and alters the immune response after spinal cord injury. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 36, n. 3, p. 171–185, mar. 2005.

CAMPOS, D. C. C. *et al.* Histological analysis of Spinal Cord Injury treated with Amniotic Membrane. **Medicina**, v. 58, n. 1, 2025.

CARVALHO, P. C. S. *et al.* Hemisseção medular experimental tratada com membrana amniótica humana- análise dos movimentos. *In: ENCONTRO LATINO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA*, 20., 2016. **Anais...**, São José dos Campos: Univap, 2016.

CASTRO, Shamyry Sulyvan De; *et al.* Visual, hearing and physical impairment: prevalence and associated factors in a population-based study. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, n. 8, p. 1773–1782, 2008.

CHANG, Biao *et al.* The effect of 807-nm light-emitting diode photobiomodulation on peripheral nerve injury. **Photochemistry and Photobiology**, v. 102, n. 1, p. 207–219, 11 jan. 2026.

CHANG, So Young; LEE, Min Young. Photobiomodulation of Neurogenesis through the Enhancement of Stem Cell and Neural Progenitor Differentiation in the Central and Peripheral Nervous Systems. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 20, out. 2023.

CHEDLY, Jamila *et al.* Physical chitosan microhydrogels as scaffolds for spinal cord injury restoration and axon regeneration. **Biomaterials**, v. 138, p. 91–107, 1 set. 2017.

CORREIA, Débora Campos Chaves *et al.* Therapeutic Potential of Photobiomodulation in Early Recovery After Experimental Spinal Cord Injury in Rats: Histological and Biomechanical Analysis. **Journal of Biophotonics**, v. 19, n. 3, 15 dez. 2025a.

CORREIA, Débora Campos Chaves *et al.* Histological analysis of Spinal Cord Injury treated with Amniotic Membrane. **Medicina (Brazil)**, v. 58, n. 1, 2025b.

COSTANZI, Rogério Nagamine. **Evolução da Despesa Previdenciária no Brasil**. S.I: FIPE, 2023.

CRIPPS, R. A. *et al.* A global map for traumatic spinal cord injury epidemiology: towards a living data repository for injury prevention. **Spinal Cord**, v. 49, n. 4, p. 493–501, 23 abr. 2011.

BRASIL. **Datasus**: relatório executivo da gestão 2011- 2014. Brasília: Ministério da Saúde, 2015.

DOMPE, Claudia *et al.* Photobiomodulation—underlying mechanism and clinical applications. **Journal of Clinical Medicine**, v. 9, n. 6, 1724, jun. 2020.

DROZDOV, A. L. *et al.* Influence of low-intensity red diode and laser radiation on the locomotor activity of sea urchin sperm. **Doklady Biochemistry and Biophysics**, v. 457, n. 1, p. 146–148, 2014.

ECKERT, Matthew J.; MARTIN, Matthew J. Trauma: Spinal Cord Injury. **Surgical Clinics of North America**, v. 97, n. 5, p. 1031-1045, out. 2017.

ELI, Ilyas; LERNER, David P.; GHOGAWALA, Zoher. Acute Traumatic Spinal Cord Injury. **Neurologic Clinics**, v. 39, n. 2, p. 471-488, maio 2021.

ELKHENANY, Hoda *et al.* Applications of the amniotic membrane in tissue engineering and regeneration: the hundred-year challenge. **Stem Cell Research and Therapy**, v. 13, n. 1, dez. 2022.

ETCHEBARNE, Marion *et al.* Use of Amniotic Membrane and Its Derived Products for Bone Regeneration: A Systematic Review. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 9, maio 2021.

FALAVIGNA, Asdruba *et al.* Experimental model of spinal cord injury (sci) in rats: management guidelines. **Coluna/Columna**, v. 12, n. 1, p. 70–72, 2013.

FAN, Baoyou *et al.* Microenvironment Imbalance of Spinal Cord Injury. **Cell Transplantation**, v. 27, n. 6, p. 853-866, 1 jun. 2018.

FAN, Baoyou; WEI, Zhijian; FENG, Shiqing. Progression in translational research on spinal cord injury based on microenvironment imbalance. **Bone Research**, v. 10, n. 1, 1 dez. 2022.

FEHLINGS, Michael G. *et al.* Early versus Delayed Decompression for Traumatic Cervical Spinal Cord Injury: Results of the Surgical Timing in Acute Spinal Cord Injury Study (STASCIS). **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, p. e32037, 23 fev. 2012.

FEITOSA, MATHEUS LEVI TAJRA. **Terapia Celular com Células-Tronco em Coelhos com Lesão Medular Induzida e em Cães com Lesão Medular Crônica Espontânea**. 2011. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

FÉNELON, Mathilde *et al.* Applications of human amniotic membrane for tissue engineering. **Membranes**, v. 11, n. 6, jun. 2021.

FLEMING, Jennifer C. *et al.* The cellular inflammatory response in human spinal cords after injury. **Brain**, v. 129, n. 12, p. 3249–3269, dez. 2006.

FREITAS, Lucas Freitas; HAMBLIN, Michael R. Proposed Mechanisms of Photobiomodulation or Low-Level Light Therapy. **IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics**, v. 22, n. 3, p. 348–364, 1 maio 2016.

FRYDENBERG, Ellen; STEEL, Timothy. Mechanisms of cervical spinal injury. **Pathology**, v. 44, p. S23, 2012.

GIACCI, Marcus K. *et al.* Differential effects of 670 and 830 nm red near infrared irradiation therapy: A comparative study of optic nerve injury, retinal degeneration, traumatic brain and spinal cord injury. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, 2014.

GLASS, Graeme Ewan. Photobiomodulation: The clinical applications of low-level light therapy. **Aesthetic Surgery Journal**, v. 41, n. 6, p. 723–738, 1 jun. 2021.

HAMBLIN, Michael R. Shining light on the head: Photobiomodulation for brain disorders. **BBA Clinical**, v. 6, p. 113-124, dez. 2016.

HAMBLIN, Michael R. Mechanisms and applications of the anti-inflammatory effects of photobiomodulation. **AIMS Biophysics**, v. 4, n. 3, p. 337-361, 2017.

HAMBLIN, Michael R. Mechanisms and Mitochondrial Redox Signaling in Photobiomodulation. **Photochemistry and Photobiology**, v. 94, n. 2, p. 199-212, 1 mar. 2018.

HAMBLIN, Michael R.; LIEBERT, Ann. Photobiomodulation Therapy Mechanisms beyond Cytochrome c Oxidase. **Photobiomodulation, Photomedicine, and Laser Surgery**, v. 40, n. 2, p. 75-77, fev. 2022.

HERMES, Túlio de Almeida *et al.* Anatomy and Imaging of the Spinal Cord: An Overview. **Seminars in Ultrasound, CT and MRI**, v. 44, n. 5, p. 400-407, 1 out. 2023.

HERNÁNDEZ-BULE, Maria Luisa *et al.* Unlocking the Power of Light on the Skin: A Comprehensive Review on Photobiomodulation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 8, abr. 2024.

HU, Rong *et al.* Glial scar and neuroregeneration: Histological, functional, and magnetic resonance imaging analysis in chronic spinal cord injury. **Journal of Neurosurgery: Spine**, v. 13, n. 2, p. 169–180, ago. 2010.

HU, Xiao *et al.* Spinal cord injury: molecular mechanisms and therapeutic interventions. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 8, n. 1, 1 dez. 2023a.

HU, Zeming *et al.* Biological importance of human amniotic membrane in tissue engineering and regenerative medicine. **Materials Today Bio, Biological importance of human amniotic membrane in tissue engineering and regenerative medicine**, v. 22, out. 2023b.

HUBERTUS, Vanessa *et al.* AO Spine Clinical Practice Recommendations for the Surgical Management of Acute Traumatic Spinal Cord Injury: Contemporary Concepts. **Global Spine Journal**, v. 15, n. 8, p. 3572–3579, 8 nov. 2025.

INGRALDI, Alison L.; AUDET, Robert G.; TABOR, Aaron J. The Preparation and Clinical Efficacy of Amnion-Derived Membranes: A Review. **Journal of Functional Biomaterials**, v. 14, n. 10, out. 2023.

JIA, Xiaofeng *et al.* Critical care of traumatic spinal cord injury. **Journal of Intensive Care Medicine**, v. 28, n. 1, p. 12-23, jan. 2013.

KARSY, Michael; HAWRYLUK, Gregory. Modern Medical Management of Spinal Cord Injury. **Current Neurology and Neuroscience Reports**, v. 19, n. 9, set. 2019.

KARU, Tiina. Photobiology of low-power laser effects. **Health Physics**, v. 56, n. 5, p. 691–704, 1989.

KESSLER, Thomas M. *et al.* Early neurological care of patients with spinal cord injury. **World Journal of Urology**, v. 36, n. 10, p. 1529–1536, 1 out. 2018.

KHAN, Fariyah Iqbal; AHMED, Zubair. Experimental Treatments for Spinal Cord Injury: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Cells**, v. 11, n. 21, 1 nov. 2022.

KÖHLER, Susanne *et al.* Gray and white matter astrocytes differ in basal metabolism but respond similarly to neuronal activity. **GLIA**, v. 71, n. 2, p. 229–244, 1 fev. 2023.

KÖHLER, Susanne; WINKLER, Ulrike; HIRRLINGER, Johannes. Heterogeneity of Astrocytes in Grey and White Matter. **Neurochemical Research**, v. 46, n. 1, p. 3–14, 1 jan. 2021.

KUMAR, Ramesh *et al.* Traumatic Spinal Injury: Global Epidemiology and Worldwide Volume. **World Neurosurgery**, v. 113, p. e345–e363, maio 2018.

LEAL-MARIN, Sara *et al.* Human Amniotic Membrane: A review on tissue engineering, application, and storage. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, v. 109, n. 8, p. 1198-1215, 1 ago. 2021.

LI, Xin *et al.* Photobiomodulation provides neuroprotection through regulating mitochondrial fission imbalance in the subacute phase of spinal cord injury. **Neural Regeneration Research**, v. 18, n. 9, p. 2005–2010, 1 set. 2023.

LICHTWARK, Glen A. *et al.* Markerless motion capture provides accurate predictions of ground reaction forces across a range of movement tasks. **Journal of Biomechanics**, v. 166, 1 mar. 2024.

LIEBERT, Ann *et al.* Photophysical Mechanisms of Photobiomodulation Therapy as Precision Medicine. **Biomedicines**, v. 11, n. 2, fev. 2023.

LILLEY, Elliot *et al.* Refining rodent models of spinal cord injury. **Experimental Neurology**, v. 328, jun. 2020.

LIMA, Rui *et al.* Pathophysiology and Therapeutic Approaches for Spinal Cord Injury. **International Journal of Molecular Sciences**, v.23, n. 22, 13833, nov. 2022.

LIMA, Leonardo B. de *et al.* Immunohistochemical Evaluation of Spinal Cord Injuries Treated with Amniotic Membrane. **ACS Omega**, v. 11, n. 5, p. 7219-7227, 2026.

MALJAARS, Lennart P. *et al.* Application of amniotic membranes in reconstructive surgery of internal organs—A systematic review and meta-analysis. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 16, n. 12, p. 1069-1090, dez. 2022.

MAMEDE, Ana C. *et al.* Amniotic membrane: From structure and functions to clinical applications. **Cell and Tissue Research**, v. 349, n. 2, p. 447-458, ago. 2012.

MAMEDE, Karina M.; SANT'ANNA, Luciana Barros. Antifibrotic effects of total or partial application of amniotic membrane in hepatic fibrosis. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, n. 3, 2019.

MARCOS, Rodrigo Labat *et al.* Photobiomodulation Controls the Expression of Lipoxin Receptors, Promoting the Resolution of the Inflammatory Process in an Experimental Tendinitis Model. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 43, n. 5, p. 1035–1044, 1 maio 2025.

MATTUCCI, Stephen *et al.* Basic biomechanics of spinal cord injury — How injuries happen in people and how animal models have informed our understanding. **Clinical Biomechanics**, v. 64, p. 58–68, 1 abr. 2019.

MELLER, Daniel *et al.* Amniotic Membrane Transplantation in the Human Eye. **Deutsches Ärzteblatt international**, v. 108, n. 14, p. 243-248, abr. 2011.

MICHEAU, Antoine; HOA, Denis. **Labeled cross-sectional anatomy of the mouse on micro-CT**, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.37019/vet-anatomy/564757.br>. Acesso em: 17 jan. 2026.

MILYUDIN, Evgeny *et al.* Amniotic Membrane Biopolymer for Regenerative Medicine. **Polymers**, v. 15, n. 5, 1 mar. 2023.

MOLINARO, Etelcia Moraes *et al.* **Conceitos e Métodos para a Formação de Técnicos em Laboratórios de Saúde**. Rio de Janeiro: IOC, 2009.

MONTINE, Kathleen S.; DINTZIS, Suzanne M.; TREUTING, Piper M. **Comparative Anatomy and Histology: A Mouse, Rat, and Human Atlas**. [S.l.]: Academic Press, 2018.

MONTOTO-MARQUÉS, Antonio *et al.* Advances and New Therapies in Traumatic Spinal Cord Injury. **Journal of Clinical Medicine**, v. 14, n. 7, 2203, abr. 2025.

MOORE, Keith L.; DALLEY, Arthur F.; AGUR, Anne M. R. **Anatomia orientada para a clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.

MOSCA, Rodrigo Crespo *et al.* Photobiomodulation Therapy for Wound Care: A Potent, Noninvasive, Photoceutical Approach. **Advances in Skin and Wound Care**, v. 32, n. 4, p. 157–167, 1 abr. 2019.

MUNOZ-TORRES, Jose R. *et al.* Biological properties and surgical applications of the human amniotic membrane. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 10, 1067480, jan. 2023.

NAESER, Margaret A.; HAMBLIN, Michael R. Traumatic Brain Injury: A Major Medical Problem That Could Be Treated Using Transcranial, Red/Near-Infrared LED Photobiomodulation. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 33, n. 9, p. 443-446, 1 set. 2015.

NAS, Kemal *et al.* Rehabilitation of spinal cord injuries. **World Journal of Orthopedics**, v. 6, n. 1, p. 8–16, 2015.

NATIONAL SPINAL CORD INJURY STATISTICAL CENTER- NSCISC. Spinal cord injury facts and figures at a glance. **Facts and Figures at a Glance**, p. 2, 2018.

NATIONAL SPINAL CORD INJURY STATISTICAL CENTER - NSCISC. **2024 Annual Report**: Complete Public Version for the Spinal Cord Injury Model Systems. University of Alabama at Birmingham: Birmingham, 2025. Disponível em: <https://bpb-us-w2.wpmucdn.com/sites.uab.edu/dist/f/392/files/2025/06/2024-Annual-Report-Complete-Public-Version-xx.pdf>. Acesso em: 20 jan. 2026

NATIONAL SPINAL CORD INJURY STATISTICAL CENTER - NSCISC. **Traumatic Spinal Cord Injury Facts and Figures at a Glance**. [S.l.: S.n.].

NEVES, MF; *et al.* Comparative analysis of movements after experimental spinal cord injury treated with amniotic membrane: Pilot study. **Neurological Disorders and Therapeutics**, v. 2, n. 2, p. 1–5, 2018.

NICODEMO, Mariana C. *et al.* Photobiomodulation and amniotic membrane for treat tendon injury in rats. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 96, p. e20231139, 2024.

NICODEMO, Mariana de Castro *et al.* Amniotic membrane as an option for treatment of acute achilles tendon injury in rats. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 32, n. 2, p. 125–139, 1 fev. 2017.

OLIVEIRA, E. C. L. *et al.* Avaliação histológica da aplicação da membrana amniótica no processo de reparo de lesão medular induzida em ratos. *In*: ENCONTRO LATINO AMERICANO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 21., 2017. **Anais...**, São José dos Campos: Univap, 2017.

ORENDÁČOVÁ, Judita *et al.* Cauda equina syndrome. **Progress in Neurobiology**. v. 64, n. 6, p. 613-637, 2001.

O'SHEA, Timothy M.; BURDA, Joshua E.; SOFRONIEW, Michael V. Cell biology of spinal cord injury and repair. **Journal of Clinical Investigation**, v. 127, n. 9, p. 3259-3270, 1 set. 2017.

OYINBO, Charles. Secondary injury mechanisms in traumatic spinal cord injury: A nugget of this multiply cascade. **Acta Neurobiol Exp.**, v. 71, n. 2, p. 281-299, 2011.

PAIVA, Vagner Clayton *et al.* Epidemiology Of Post-Traumatic Spinal Cord Injury In A Tertiary Hospital. **Acta Ortopedica Brasileira**, v. 31, n. 5, 2023.

PAULA, Alecsandra Araújo. **Efeito da terapia com laser de baixa intensidade na recuperação de lesão medular traumática**. São José dos Campos, 2011. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) - Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2011.

PAULA, Alecsandra Araujo *et al.* "Low-intensity laser therapy effect on the recovery of traumatic spinal cord injury". **Lasers in Medical Science**, v. 29, n. 6, p. 1849–1859, 31 out. 2014.

PEDRAM, Mir Sepehr *et al.* Therapeutic effects of simultaneous Photobiomodulation therapy (PBMT) and Meloxicam administration on experimental acute spinal cord injury: Rat animal model. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 189, p. 49–54, 1 dez. 2018.

RAMOS, Luciano *et al.* Infrared (810 nm) low-level laser therapy in experimental model of strain-induced skeletal muscle injury in rats: Effects on functional outcomes. **Photochemistry and Photobiology**, v. 88, n. 1, p. 154–160, jan. 2012.

RAMOS, Luciano *et al.* Characterization of Skeletal Muscle Strain Lesion Induced by Stretching in Rats: Effects of Laser Photobiomodulation. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 36, n. 9, p. 460–467, 1 set. 2018.

RASTOGI, Anisha *et al.* The neural representation of force across grasp types in motor cortex of humans with tetraplegia. **eNeuro**, v. 8, n. 1, p. 1–23, 1 jan. 2021.

ROWLAND, James W. *et al.* Current status of acute spinal cord injury pathophysiology and emerging therapies: promise on the horizon. **Neurosurgical focus**, v. 25, n. 5, p. E2, 2008.

SALEHPOUR, Farzad *et al.* A protocol for transcranial photobiomodulation therapy in mice. **Journal of Visualized Experiments**, v. 2018, n. 141, 1 nov. 2018.

SANT'ANNA, L. B. *et al.* Long-term effects of human amniotic membrane in a rat model of biliary fibrosis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 50, n. 7, 2017.

SANT'ANNA, Luciana B. *et al.* Amniotic membrane application reduces liver fibrosis in a bile duct ligation rat model. **Cell Transplantation**, v. 20, n. 3, p. 441–453, 2011.

SANTOS, Solange Almeida *et al.* Photobiomodulation therapy associated with treadmill training in the oxidative stress in a collagen-induced arthritis model. **Lasers in Medical Science**, v. 32, n. 5, p. 1071–1079, 1 jul. 2017.

SANTOS, Joelita de Alencar F; *et al.* Diabetic Foot Wounds Treated With Human Amniotic Membrane and Low-level Laser Therapy: A Pilot Clinical Study. **Wound management & prevention**, v. 67, n. 8, p. 16–23, ago. 2021.

SARVARI, Raana *et al.* A comprehensive review on methods for promotion of mechanical features and biodegradation rate in amniotic membrane scaffolds. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 33, n. 3, mar. 2022.

SCHOELLER, Soraia Dornelles *et al.* **Abordagem multiprofissional em lesão medular: saúde, direito e tecnologia.** Florianópolis: IFSC, 2016.

SENGUL, Gulgun; WATSON, Charles. Ascending and Descending Pathways in the Spinal Cord. *In*: PAXINOS, George. **The Rat Nervous System**. 4th ed. [S.l.]: Elsevier Inc., 2015. p. 115–130.

SILVA, Nuno A. *et al.* From basics to clinical: A comprehensive review on spinal cord injury. **Progress in Neurobiology**, v. 114, p. 25-57, 2014.

SOBOLEV, Vladislav E. *et al.* Animal Models of Spinal Cord Injury. **Biomedicines**, v. 13, n. 6, jun. 2025.

SONG, Ji Wei *et al.* Low-level laser facilitates alternatively activated macrophage/microglia polarization and promotes functional recovery after crush spinal cord injury in rats. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 1 dez. 2017.

SOUZA, Fabiano Inácio de *et al.* Monossialogangliosídeo transdérmico com laser no tratamento de lesão medular espinal de ratos. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 21, n. 2, p. 87–91, abr. 2013.

TAN, Sheryl; FAULL, Richard L. M.; CURTIS, Maurice A. The tracts, cytoarchitecture, and neurochemistry of the spinal cord. **Anatomical Record**, v. 306, n. 4, p. 777-819, 1 abr. 2023.

TATOR, Charles H. Update on the Pathophysiology and Pathology of Acute Spinal Cord Injury. **Brain Pathology**, v. 5, n. 4, p. 407–413, 28 out. 1995.

THAKUR, Jai Deep *et al.* George Chance and Frank Holdsworth: Understanding Spinal Instability and the Evolution of Modern Spine Injury Classification Systems. **Neurosurgery**, v. 86, n. 6, p. E509-E516, 1 jun. 2020.

TOBELEM, Daysi da Cruz *et al.* Effects of photobiomodulation in experimental spinal cord injury models: A systematic review. **Journal of Biophotonics**, v. 15, n. 8, ago. 2022.

TRAN, Amanda Phuong; WARREN, Philippa Mary; SILVER, Jerry. The Biology of Regeneration Failure and Success After Spinal Cord Injury. **Physiological Reviews**, v. 98, n. 2, p. 881–917, 1 abr. 2018.

TREUTING, Piper M.; DINTZIS, Suzanne M.; MONTINE, Kathleen S. **Comparative anatomy and histology** : a mouse, rat and human atlas. [S.l.]: Academic Press, an imprint of Elsevier, 2018.

VAN DEN HAUWE, Luc; FLANDERS, Adam E. Spinal Trauma and Spinal Cord Injury (SCI). In: HODLER, J. *et al.* **Diseases of the Brain, Head and Neck, Spine 2020–2023**: Diagnostic Imaging. [S.l.]: Springer, 2024. p. 285–294.

VENKATESH, Katari *et al.* Spinal cord injury: pathophysiology, treatment strategies, associated challenges, and future implications. **Cell and Tissue Research**, v. 377, n. 2, p. 125-151, 14 ago. 2019.

VERONEZ, Suellen *et al.* Effects of different fluences of low-level laser therapy in an experimental model of spinal cord injury in rats. **Lasers in Medical Science**, v. 32, n. 2, p. 343–349, 1 fev. 2017.

WALKDEN, Andrew. Amniotic membrane transplantation in ophthalmology: An updated perspective. **Clinical Ophthalmology**, v. 14, p. 2057-2072, 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **International perspectives on Spinal Cord Injury**. Geneva: WHO, 2013.

WU, Xingjia *et al.* 810 nm wavelength light: An effective therapy for transected or contused rat spinal cord. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 41, n. 1, p. 36–41, jan. 2009.

YANG, Luodan *et al.* Non-invasive photobiomodulation treatment in an Alzheimer Disease-like transgenic rat model. **Theranostics**, v. 12, n. 5, p. 2205–2231, 2022.

YAO, Chun *et al.* A Brief Summary of Current Therapeutic Strategies for Spinal Cord Injury. **Engineering**, v. 13, p. 46-52, 1 jun. 2022.

YU, Lin *et al.* Principal Component Analysis of the Running Ground Reaction Forces With Different Speeds. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 9, 25 mar. 2021.

ZEIN, Randa; SELTING, Wayne; HAMBLIN, Michael R. Review of light parameters and photobiomodulation efficacy: dive into complexity. **Journal of Biomedical Optics**, v. 23, n. 12, p. 1, 11 dez. 2018.

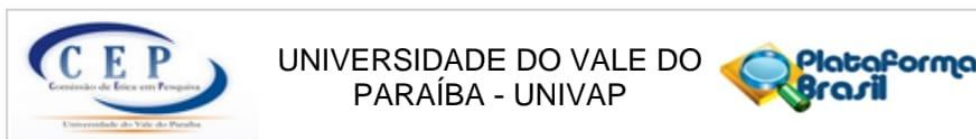
ZHANG, Cheng *et al.* Early electrical field stimulation prevents the loss of spinal cord anterior horn motoneurons and muscle atrophy following spinal cord injury. **Neural Regeneration Research**, v. 13, n. 5, p. 869–876, 1 maio 2018.

ZHANG, Jiawei *et al.* Low-level laser therapy 810-nm up-regulates macrophage secretion of neurotrophic factors via PKA-CREB and promotes neuronal axon

regeneration in vitro. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 24, n. 1, p. 476–487, 1 jan. 2020.

ZHANG, Zhixin *et al.* The Role of Photobiomodulation to Modulate Ion Channels in the Nervous System: A Systematic Review. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 44, n. 1, dez. 2024.

ANEXO A - COMPROVANTE DE APROVAÇÃO DO PROJETO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Membrana amniótica e terapia a laser de baixa intensidade como opção para o tratamento da contusão medular em ratos

Pesquisador: Débora Campos Chaves

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 58916222.0.0000.5503

Instituição Proponente: Universidade do Vale do Paraíba - UNIVAP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

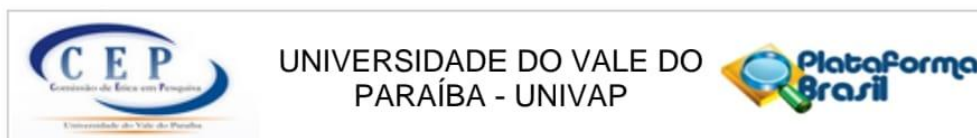
Número do Parecer: 5.495.002

Apresentação do Projeto:

O projeto é uma pesquisa de estudo, quantitativa, básica, explicativa e experimental. A amostra consistirá de 4 placentas humanas, as quais serão utilizadas para obtenção da membrana amniótica humana (MA), a qual será processada e fragmentada em dimensões adequadas que permitam cobrir a lesão medular (LM) induzida nos animais experimentais. Estes animais serão divididos em em cinco grupos: SHAM (controle, sem contusão medular), I (contusão medular sem aplicação de tratamento), MA (contusão medular + aplicação de MA), PBM (contusão medular + aplicação de PBM) e PBMMA (contusão medular + aplicação de MA associada à PBM). Os tratamentos propostos, descritos em cada grupo experimental, serão aplicados imediatamente após a indução da LM. Os animais de todos os grupos serão, também, submetidos à análise de movimento. Após 7 e 14 dias do início do tratamento, os animais serão eutanasiados e a região da coluna vertebral entre T6 e T12, rim, músculos dos membros posteriores e fêmures serão excisados e encaminhados para análises histológica, imunohistoquímica e por espectroscopia FT-IR. Por fim, os resultados serão submetidos às análises estatísticas correspondentes.

O projeto de pesquisa tem por objetivo a aplicação da Membrana Amniótica, obtida da placenta humana colhida, em lesões medulares em ANIMAIS exclusivamente, sendo caracterizada como uma terapia regenerativa. A Carta de Anuência deixa explícito que esse biomaterial não poder ser aplicado em estudos com seres humanos.

Endereço: Av. Shishima Hifumi, 2911 - Bloco 11 (IP&D), Sala 13
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: 5.495.002

As informações elencadas nos campos apresentação do projeto, objetivo de pesquisa e avaliação dos riscos e benefícios foram retiradas do arquivo Informações Básicas do Projeto (formulário online da Plataforma Brasil).

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar e comparar a eficácia da aplicação de MA humana (MA) e PBM, isoladas ou em associação, na fase inicial do reparo tecidual de contusão medular (LM) cirurgicamente induzida em ratos.

Objetivo Secundário:

Avaliar e comparar a ação da MA e da PBM aplicadas após a contusão medular (LM) induzida em ratos, quanto a: a) Cinemática e índice funcional do ciático dos membros afetados; b) Resposta inflamatória na região da medula espinhal; c) Processo de reparo tecidual na medula espinhal: formação de cavitação, células da glia e neurônios; d) Histologia renal, dos músculos posteriores e femures; e) Alterações bioquímicas por meio da análise com espectroscopia Raman e FT-IR.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

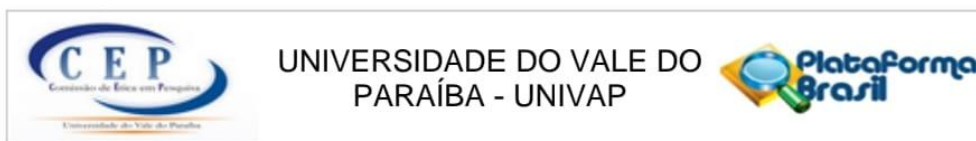
A colheita da placenta é um procedimento seguro. A colheita da placenta é um procedimento seguro, e a equipe de enfermagem que está conversando com você foi informada sobre a pesquisa em questão, e estará à disposição para esclarecer dúvidas. Pode haver risco de quebra de sigilo profissional, mas este será minimizado pela não divulgação do seu nome ou das iniciais do seu nome, e somente pelo uso de código numérico.

Pode haver o risco de constrangimento, pelo fato da gestante ser abordada em um momento que antecede o parto, porém este será minimizado pela forma de abordagem realizada pela enfermeira em ambiente reservado, no que se refere ao aceite ou não da participação e da liberação dos dados da carteirinha do pré-natal referente aos exames sorológicos.

Benefícios:

Espera-se que os resultados desta pesquisa permitam avaliar benefícios decorrentes da aplicação da membrana amniótica e da fotobiomodulação, isoladamente ou em associação, em lesão medular por contusão, para que esse ramo de estudos se expandam e possam ser transportados

Endereço: Av. Shishima Hifumi, 2911 - Bloco 11 (IP&D), Sala 13
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: 5.495.002

para a prática clínica
em humanos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Ver Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Ver Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Em parecer anterior, este CEP indicou pendências, agora sanadas.

1- No TCLE, faltam nomes da equipe executora, presentes no formulário online. Uniformizar informações.
Pendência ATENDIDA.

2- No TCLE, detalhar coleta, será anônima?
Pendência ATENDIDA.

Foram adequadas todas as informações referentes aos procedimentos de coleta de dados dos exames pré-natais e da forma de identificação da placenta colhida, tanto no TCLE quanto no Projeto Brochura.

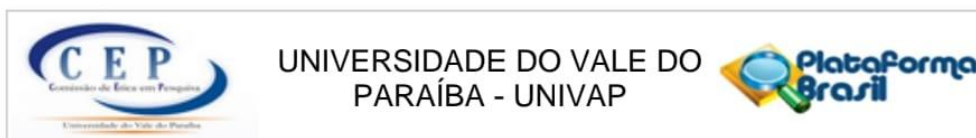
3- No TCLE, CEP está na sala 13, não mais na sala 33.
Pendência ATENDIDA.

4- No TCLE, participação consistirá em ceder a placenta e informações da carteirinha.
Pendência ATENDIDA.

Foram adequadas todas as informações referentes aos procedimentos de coleta de dados dos exames pré-natais e da forma de identificação da placenta colhida no Projeto Brochura.

5- No formulário online: No item 'Intervenções a serem realizadas', fazer o mesmo ajuste indicado no item anterior referente ao TCLE (participação consistirá em ceder a placenta e informações da

Endereço: Av. Shishima Hifumi, 2911 - Bloco 11 (IP&D), Sala 13
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: 5.495.002

carteirinha).

Pendência ATENDIDA.

6- Alterar ordem de texto, no item metodologia, para especificar que primeiro obtém consentimento e só após consulta a carteirinha do pré-natal.

Pendência ATENDIDA.

Foram adequadas todas as informações referentes aos procedimentos de coleta de dados dos exames pré-natais e da forma de identificação da placenta colhida, tanto no TCLE quanto no Projeto Brochura.

7- Ao reenviar projeto, se necessário, rever cronograma.

Pendência ATENDIDA.

8- Caso já exista parecer do CEUA, este CEP recomenda anexá-lo na Plataforma Brasil. Caso não tenha este parecer, informar na carta resposta sobre o estado atual do trâmite.

Pendência ATENDIDA.

Os pesquisadores informam que O projeto de pesquisa em animais foi submetido ao CEUA em 21 de maio de 2022. A rotina de submissão de projetos a essa Comissão não gera nenhum protocolo. Dessa forma, não tenho nenhuma comprovação da submissão. A reunião do CEUA está prevista para 09 de junho de 2022.

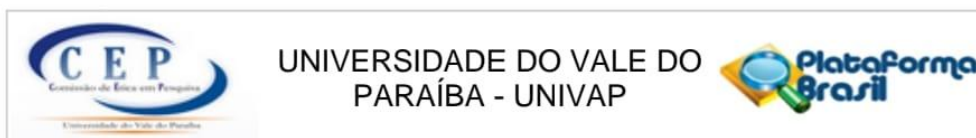
Considerações Finais a critério do CEP:

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 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 (veja modelo no site do CEP-Univap):

- Dados do projeto: Registro CONEP e

- Título do Projeto e Dados dos participantes: total de participantes recrutados, incluídos,

Endereço: Av. Shishima Hifumi, 2911 - Bloco 11 (IP&D), Sala 13
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: 5.495.002

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.

CEP-Univap - (12) 3947-1111

www.univap.br/cep

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1952568.pdf	06/06/2022 18:14:26		Aceito
Outros	030622CARTARESPOSTAAPENDENCIA_CORRIGIDA.docx	03/06/2022 17:54:55	Débora Campos Chaves	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE0306.docx	03/06/2022 17:45:44	Débora Campos Chaves	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoBrochura0306.docx	03/06/2022 17:45:33	Débora Campos Chaves	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	20/05/2022 20:17:24	Débora Campos Chaves	Aceito
Outros	Termotreinamentoenfermeiras.pdf	20/05/2022 18:37:48	Débora Campos Chaves	Aceito
Outros	Termohospital.pdf	20/05/2022 18:37:13	Débora Campos Chaves	Aceito
Cronograma	CronogramaDeboraFinal.docx	20/05/2022 18:32:11	Débora Campos Chaves	Aceito
Orçamento	ORCAMENTOFINAL.docx	20/05/2022 18:29:40	Débora Campos Chaves	Aceito

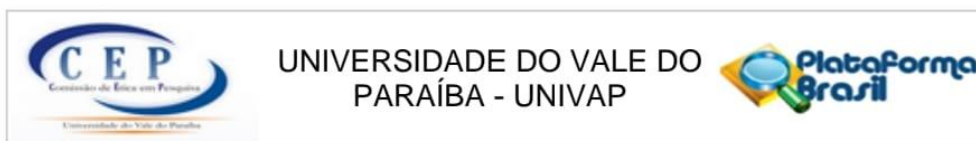
Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av. Shishima Hifumi, 2911 - Bloco 11 (IP&D), Sala 13
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: 5.495.002

SAO JOSE DOS CAMPOS, 28 de Junho de 2022

Assinado por:
Mauricio Martins Alves
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Shishima Hifumi, 2911 - Bloco 11 (IP&D), Sala 13
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

ANEXO B – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "**MEMBRANA AMNIÓTICA E FOTOBIMODULAÇÃO COMO OPÇÃO PARA O TRATAMENTO DE CONTUSÃO MEDULAR EM RATOS**", registrada com o protocolo nº **A8-CEA-2022**, sob a responsabilidade de Emilia Angela Lo Schiavo Arisawa, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa- encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP), em reunião de **_09 / _06 / 2022**.

Vigência da autorização	20/08/2022-30/07/2025
Finalidade () Ensino (x) Pesquisa Científica	
Nº da Solicitação ou Autorização SISBIO	Não se aplica
Atividade(s)	() Captura () Coleta de espécimes () Marcação (X) Outras: Coleta de informações
Espécies/Grupos Taxonômicos	<i>Rattus Norvegicus</i> (rato)
Local(is) de realização das atividades	Biotério IP&D-UNIVAP






Cristina Pacheco Soares
Profa. Dra. Cristina Pacheco Soares
Coordenadora CEUA-UNIVAP

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA
IP&D - Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento
Av. Shishima Hifumi, 2911 - Urbanova CEP 12244-000 PABX(012) 349.1000 FAX(012) 349.1252 Caixa Postal 82 S.J.Campos-SP

Email: ceua@univap.br

Histological analysis of Spinal Cord Injury treated with Amniotic Membrane

Análise histológica de lesão medular tratada com membrana amniótica

Débora Campos Chaves Correia , Leonardo Borges de Lima , Luciana Barros Sant'anna , Mário Oliveira Lima , Emilia Angela Lo Schiavo Arisawa 

ABSTRACT

Spinal cord injury (SCI) is one of the most harmful syndromes that affects humans due to neuronal destruction and interruption of the nerve impulse transmission between axons. The conduction of motor, sensory, and autonomic responses below the level of the injury is seriously compromised, generating high treatment costs for the health system and a reduction in quality of life, stimulating research into new treatment protocols. This study aimed to evaluate the effectiveness of a biomaterial, the amniotic membrane (AM), to treat experimentally induced SCI. 15 adult rats were divided into three groups ($n = 5$): S (Sham), L (SCI without treatment), and AM (SCI treated with AM). Spinal cord injury was induced in the region T9-T10 by direct trauma, free-falling a weight (10 g, 2 mm flat edge) held on a mini guillotine, 25 mm above the exposed spinal cord. A fragment of AM, obtained from the human placenta after maternal consent, was applied to the injured area only in the AM group. After 28 days, specimens from the area of spinal cord injury were excised and subjected to routine histological procedures. Data from the semi-quantitative score, obtained from a scheme that assigned different scores to regions of the spinal cord, and from the quantitative analysis were subjected to parametric statistical analysis. Results showed that Group S presented medullary tissue without changes (score 0). In contrast, Group L presented numerous areas of cavitation in the dorsal and lateral regions of the white and gray matter (9.61 ± 6.60 $p < 0.001$) with an intense inflammatory infiltrate. The AM group exhibited small areas of cavitation in the dorsal and lateral regions of the white matter and part of the dorsal columns in the gray matter (0.94 ± 1.03 , $p < 0.001$), with few inflammatory cells. The results suggest the effectiveness of AM in the treatment of induced SCI, characterized by a reduction in the evolution of inflammatory and degenerative processes in the central nervous tissue compared to the untreated group.

Keywords: Spinal cord injury, Amniotic membrane, Biomaterial, Healing, Regenerative medicine.

RESUMO

A lesão medular (LM) é uma das síndromes mais prejudiciais que afeta os humanos como consequência da destruição neuronal e da interrupção da transmissão do impulso nervoso entre os axônios. A condução das respostas motoras, sensoriais e autonômicas abaixo do nível da lesão fica gravemente comprometida, gerando custos elevados de tratamento para o sistema de saúde, com redução da qualidade de vida, estimulando pesquisas por novos protocolos de tratamento. Este estudo teve como objetivo avaliar a eficácia de um biomaterial, a membrana amniótica (MA), no tratamento da LM induzida experimentalmente. 15 ratos adultos foram divididos em três grupos ($n = 5$): S (Sham), L (LM sem tratamento) e AM (LM tratado com MA). A lesão medular foi induzida na região T9-T10, por trauma direto, pela queda livre de um peso (10 g, borda plana de 2 mm) preso

University of Paraíba Valley, São José dos Campos, (SP), Brazil



Este é um artigo publicado em acesso aberto (Open Access) sob a licença Creative Commons Attribution, que permite uso, distribuição e reprodução em qualquer meio sem restrições, desde que o trabalho original seja corretamente citado.

<https://doi.org/10.11606/issn.2176-7262.mrp.2025.222620>

RESEARCH ARTICLE **OPEN ACCESS**

Therapeutic Potential of Photobiomodulation in Early Recovery After Experimental Spinal Cord Injury in Rats: Histological and Biomechanical Analysis

Débora Campos Chaves Correia¹  | Leonardo Borges de Lima¹ | Mário Oliveira Lima² | Luis Filipe Karatanasov Beloni² | Raduan Hage³ | Emilia Angela Lo Schiavo Arisawa¹

¹BioStimulation and Tissue Repair Laboratory, Universidade do Vale do Paraiba—UNIVAP, São José dos Campos, Brazil | ²Sensorimotor Rehabilitation Engineering Laboratory, Universidade do Vale do Paraiba—Univap, São José dos Campos, Brazil | ³Small Animal Veterinary Clinic, Universidade do Vale do Paraiba—Univap, São José dos Campos, Brazil

Correspondence: Emilia Angela Lo Schiavo Arisawa (mirela@univap.br)

Received: 1 July 2025 | Revised: 13 October 2025 | Accepted: 14 November 2025

Keywords: movement | nervous system | neuroprotection | photobiomodulation | spinal cord injury

ABSTRACT

Spinal cord injury (SCI) leads to severe functional deficits, underscoring the critical need for new therapies. This study evaluated the efficacy of photobiomodulation (PBM) as an early, noninvasive treatment for induced SCI, using specific parameters (808 nm, 72 J/cm², 100 mW). A total of 15 rats were divided into Control (C), SCI, and PBM groups. Efficacy was determined by an integrated approach, correlating ground reaction force (GRF) with quantitative histological assessment. The PBM group showed a significant reduction of secondary damage (33.3 ± 5.5 vs. 53.9 ± 7.0 in the SCI group; $p = 0.0002$) and preserved neural structure. This tissue preservation aligns with the GRF analysis, which demonstrated that the PBM group recovered gait patterns similar to the Control group. In conclusion, PBM effectively mitigates necrosis aerea, maintaining tissue integrity, improving functional recovery, and reinforcing the PBM's therapeutic potential as a promising translatable strategy for outcomes after SCI. Further research should include immunostaining of cells and larger samples.

1 | Introduction

Spinal cord injury (SCI) is characterized by the interruption of neural pathways in the spinal cord, often resulting in considerable sensorimotor deficits, compromised autonomic regulation, and distinct levels of temporary or permanent disability [1]. The global incidence of SCI has increased over the last few decades, primarily associated with traffic accidents and falls [2–4]. The global incidence ranges from 10.4 to 83 cases per million people per year, depending on the country and data collection methods used. Approximately 12 000 new cases are reported annually in the United States, and the medical expenses, rehabilitation, and loss of productivity can exceed \$1 million per person. In Brazil, although there is a lack of accurate national data on the incidence of SCI, it is estimated that 12–18 million people live with

some form of physical disability. According to the Brazilian Institute of Geography and Statistics (IBGE), approximately 1.3% of the population has some form of severe motor disability [5–8].

The severity and anatomical level of SCI significantly influence neurological recovery. Thoracic and penetrating spinal cord injuries are more likely to result in complete injury, with less expectation of functional recovery [9]. Motor and sensory deficits arise due to the interruption of descending and ascending neural pathways formed by motor and sensory axons [10]. Experimental studies using animal models are conducted to understand the histopathological processes and motor impairment of SCI, validated by three types of SCI models: transection, contusion, and compression [11]. Among these, contusion SCI is a particularly

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2025 The Author(s). *Journal of Biophotonics* published by Wiley-VCH GmbH.



Kinematic and sensory-motor analysis of the effects of treatments with photobiomodulation in rats with experimentally induced spinal injury

Luis Filipe Karatanasov Beloni¹ · Leonardo Borges de Lima¹ · Débora Campos Chaves Correia¹ · Alessandro Corrêa Mendes¹ · Luciana Barros Sannt'Anna¹ · Emilia Angela Lo Schiavo Arisawa¹ · Fernanda Pupio Silva Lima¹ · Mario Oliveira Lima¹

Received: 5 December 2024 / Accepted: 5 March 2025
© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag London Ltd., part of Springer Nature 2025

Abstract

The aim of this study was to evaluate the kinematic and sensorimotor parameters after application of photobiomodulation (PBM) in rats with experimentally induced spinal cord injuries (SCI). The animals were randomly divided into 3 experimental groups containing 5 animals each and respecting the following arrangement: C (control, simulation of surgical procedures); I (injury, induction of SCI) and PBM (photobiomodulation, SCI+application of photobiomodulation therapy). All animals underwent movement tests after 3, 7, 10 and 14 days, respectively, after the surgical procedure, and the following movement parameters were evaluated: mean velocity (MV), ground reaction force (GRF) and sciatic functional index (SFI) using integrated equipment capable of digitally collecting the proposed data. The mean results of the MV data obtained by groups C, I and PBM were compared and a statistically significant difference was found, being: C x I ($p=0.001$) and I x PBM ($p=0.002$), respectively. Considering the SFI data obtained by groups C, I and PBM, a statistically significant difference was observed when comparing C x I ($p=0.011$). The mean results of the GRF data obtained by groups C, I and PBM were compared and the results showed a statistically significant difference in C x I ($p=0.001$), C x PBM ($p=0.026$) and I x PBM ($p=0.002$), respectively. Therefore, there was an improvement in motor function between the 7th and 14th day after SCI, represented by the increase in speed and better GRF distribution in the PBM group.

Keywords Spinal cord injury · Photobiomodulation · Gait analysis · Sciatic functional index · Kinematics

✉ Luis Filipe Karatanasov Beloni
luis.filipe.beloni@gmail.com

✉ Mario Oliveira Lima
molmariooliveiralima@gmail.com

Leonardo Borges de Lima
leonardolima1458@gmail.com

Débora Campos Chaves Correia
debychaves@gmail.com

Alessandro Corrêa Mendes
alcomen@gmail.com

Luciana Barros Sannt'Anna
lucianabsa@univap.br

Emilia Angela Lo Schiavo Arisawa
mirelarisawa@hotmail.com

Fernanda Pupio Silva Lima
fpupiolima@gmail.com

¹ Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, Brazil

Introduction

Spinal cord injury (SCI) is defined as partial or total interruption of the neurological signal, with consequent decrease or total loss of motor and/or sensory function due to trauma to the neural elements of the spinal cord, such as the conus medullaris, cauda equina or the spinal cord itself. The worldwide incidence of SCI ranges from 10.4 to 83 cases per million people per year, which results in high morbidity and mortality and is associated with lifetime health care costs ranging from US\$ 1.1 to US\$ 5.4 million and numerous costs to the community and society [1–4].

According to the American Spinal Injury Association (ASIA), SCI can be classified as complete or incomplete, depending on the severity of the neurological level affected, and can result in paresis or paralysis and reduced or lack of sensation below the level of injury. Urinary tract infections,

Immunohistochemical Evaluation of Spinal Cord Injuries Treated with Amniotic Membrane

Leonardo B. de Lima, Débora C. C. Correia, Luciana B. Sant'anna, and Emilia A. L. S. Arisawa*

Cite This: <https://doi.org/10.1021/acsomega.5c07369>

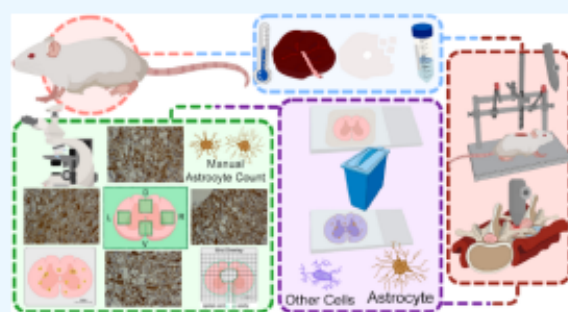
Read Online

ACCESS |

Metrics & More

Article Recommendations

ABSTRACT: Spinal cord injury (SCI) severely disrupts central nervous system (CNS) function by interrupting sensory and motor signal transmission, often resulting in permanent deficits due to the formation of a glial scar. Although the amniotic membrane (AM) is derived from the human placenta and is a promising biomaterial, its efficacy in treating SCI remains unexplored. This study investigates the therapeutic potential of AM fragments in a surgically induced acute SCI model in rats, focusing on preserving tissue integrity and modulating astrocyte distribution and reactivity. SCI was experimentally induced by a drop-weight mini-guillotine model in rats, which were subsequently allocated into three groups: Control (C), Injury (I), and Amniotic Membrane (AM), where a 4 cm² AM fragment was applied over the lesion. Animals were euthanized after 28 days for histological and immunohistochemical analysis of the T9-T10 region, specifically to assess Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) expression and identify reactive astrocytes. The application of AM significantly preserved nervous tissue structure. The cystic cavity area in the AM group (9.00 ± 7.65) was drastically lower than in the Injury group (41.80 ± 11.30). Crucially, the AM fragments attenuated the progression of nervous tissue degeneration, limiting cavitation and glial scar formation while reducing astrocytic reactivity. These findings establish AM as a viable and effective scaffold for acute SCI treatment.



INTRODUCTION

The spinal cord (SC) serves as a fundamental communication channel within the central nervous system (CNS), regulating both sensory and motor functions. It receives signals from and transmits signals to the peripheral nervous system (PNS).¹ Spinal cord injuries (SCI) are characterized by partial or complete interruption of these signals, which significantly impacts the quality of life of affected individuals.² The severity and resulting disability of SCI are directly related to the region and intensity of the injury. These injuries are commonly associated with motor vehicle accidents, domestic or occupational accidents, violence, sports, infections, tumors, and herniated discs. SCI predominantly affects men of working age, and effective public health preventive actions remain insufficient.^{3–5} SCI pathology is classically divided into two phases. The primary phase is caused by direct aggression to the nervous tissue, resulting in cellular destruction, vascular and axonal rupture, and structural damage. The secondary phase is consequent to the ensuing inflammatory response, which includes edema formation, release of pro-inflammatory mediators and reactive oxygen species, recruitment of immune cells, and subsequent cellular degeneration and necrosis.^{6–9} Endogenous mechanisms associated with impaired biochemical changes in the microenvironment favor the progression of tissue damage, thereby hindering homeostasis. Microscopically, SCI

induces microcavitation and macrocavitation, cellular necrosis, architectural changes, vascular rupture, neuronal loss, axonal rupture, and glial attraction, primarily involving astrocytes and microglia.^{10–13} Histological techniques can identify cell death and the subsequent formation of glial scars in the nervous tissue. Immunohistochemistry, based on the antigen–antibody complex, is used to detect specific structures with high sensitivity. Astrocytes, the glial cells predominantly associated with glial scarring, present glial fibrillary acidic protein (GFAP) in their intermediate filaments, which is commonly employed as a specific marker.¹⁴ Astrocytes belong to the neural stroma, providing structural support and nutrition, and acting directly on blood vessels. They are classified as protoplasmic astrocytes (gray matter) and fibrous astrocytes (white matter). Postinjury astrocytic reactivity leads to significant changes in the tissue microenvironment, including the loss of parenchymal cells and their replacement by stromal cells, ultimately resulting in the

Received: July 25, 2025

Revised: January 7, 2026

Accepted: January 13, 2026

WILEY

Dear Mrs. Débora Campos Chaves Correia,

Thank you for submitting your manuscript "Beyond Monotherapy: A Combinatorial Approach to Overcoming Inhibitory Environments in Spinal Cord Injury." to Advanced Healthcare Materials. Your unique manuscript ID is: 7681798.

We will confirm this submission with all authors of the manuscript.

As submitting author, you will be the primary recipient of communications from the journal. You will be responsible for responding to editorial queries and making updates to the manuscript if needed.

You can visit the manuscript details page at any time to track the status of your manuscript.

[MANUSCRIPT DETAILS](#)

Kind regards,
Advanced Healthcare Materials

APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Dados de identificação

Título do Projeto: Membrana amniótica e terapia a laser de baixa intensidade como opção para o tratamento da contusão medular em ratos

Pesquisador Responsável: Emilia Angela Lo Schiavo Arisawa

Equipe: Emilia Angela Lo Schiavo Arisawa (+5512991455100; mirela@univap.br); Luciana Barros Sant'Anna (e-mail: lucianabsa@univap.br).

Instituição a que pertence o Pesquisador Responsável: Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento- UNIVAP

Telefones para contato (12)98294-8000, (12) 39471169; (12) 3947-1103.

Nome do participante: _____ R.G.

Idade: _____ anos CÓDIGO: _____

A Sr.^a está sendo convidada a participar do projeto de pesquisa tendo como título "MEMBRANA AMNIÓTICA E TERAPIA A LASER DE BAIXA INTENSIDADE COMO OPÇÃO PARA O TRATAMENTO DA CONTUSÃO MEDULAR EM RATOS", de responsabilidade da pesquisadora Débora Campos Chaves Correia. O objetivo deste é avaliar e comparar a eficácia da aplicação da membrana amniótica humana e da fotobiomodulação (PBM), com a aplicação de laser, isoladas ou em associação, na fase inicial do reparo tecidual de contusão medular cirurgicamente induzida em ratos. Espera-se que os resultados desta pesquisa permitam avaliar benefícios decorrentes da aplicação da membrana amniótica e da fotobiomodulação, isoladamente ou em associação, em lesão medular por contusão, para que esse ramo de estudos se expandam e possam ser transportados para a prática clínica em humanos. A membrana amniótica humana é a parte interna das membranas fetais (também conhecida como "bolsa das águas", a qual que se rompe para dar início ao parto), que juntamente com a placenta são retiradas pelo médico obstetra do organismo materno logo após o parto, e descartadas pelo hospital, não tendo mais nenhuma função para a mãe ou bebê. A membrana amniótica é um tecido humano muito rico em células tronco (aquelas capazes de se transformarem em diferentes tipos de células que formam os tecidos do nosso corpo). Além disto, esta membrana é anti-inflamatória, reduz formação de cicatrizes, não induz rejeição, e estimula a capacidade do corpo de regenerar seus tecidos e órgãos, quando estes são danificados por traumas ou doenças degenerativas, as quais causam a perda da função do órgão e levam a diminuição da qualidade de vida.

Sua participação consistirá em ceder a placenta. A colheita da sua placenta será feita somente após o nascimento do bebê e após a retirada, pelo médico, do seu corpo. Nesse momento a placenta e as membranas fetais serão inspecionadas pelo médico e colocadas em um saco plástico estéril, sem a identificação do seu nome, nem as iniciais, dentro de caixa térmica refrigerada, e entregue ao pesquisador responsável pelo estudo, o qual transportará para o laboratório onde será utilizada de acordo com o objetivo do estudo.

A colheita da placenta é um procedimento seguro, e a equipe de enfermagem que está conversando com você foi informada sobre a pesquisa em questão, e estará

à disposição para esclarecer dúvidas. Pode haver risco de quebra de sigilo profissional, mas este será minimizado pela não divulgação do seu nome ou das iniciais do seu nome, e somente pelo uso de código numérico. Pode haver o risco de constrangimento, pelo fato da gestante ser abordada em um momento que antecede o parto, porém este será minimizado pela forma de abordagem realizada pela enfermeira em ambiente reservado, no que se refere ao aceite ou não da participação e da liberação dos dados da carteirinha do pré-natal referente aos exames sorológicos.

Garantimos o sigilo e a confidencialidade das informações que você fornecer, assim como sua privacidade, pois não será divulgado seu nome, nem as iniciais do seu nome, em momento algum. A qualquer momento, você pode se recusar a participar e se retirar da pesquisa, sem constrangimentos, penalidades ou qualquer prejuízo (caso esteja em acompanhamento ou tratamento, este permanece como está, nada muda). As informações e materiais obtidos nesta pesquisa não poderão ser utilizados para outras finalidades que não sejam a desta pesquisa científica.

Todos os gastos decorrentes da sua participação nesta pesquisa, caso ocorram, serão imediatamente e integralmente ressarcidos, incluindo gastos do participante e de quem o acompanhe. No caso de eventual dano, imediato ou tardio, decorrente desta pesquisa, você também tem direito de ser indenizado pelo pesquisador desta pesquisa, bem como a ter assistência gratuita, integral e imediata, pelo tempo que for necessário.

Sempre que desejar, você poderá entrar em contato para obter informações sobre este projeto de pesquisa, sobre sua participação ou outros assuntos relacionados à pesquisa, com a pesquisadora responsável ou equipe executora pelo telefone (12)3947-1103 e e-mail debychaves@gmail.com. Você também pode entrar em contato com o CEP – Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP), corresponsável por garantir e zelar pelos direitos do participante da pesquisa, pelo telefone (12) 3947-1111, pelo e-mail cep@univap.br ou pessoalmente na Av. Shishima Hifumi, 2911, Urbanova – Bloco 11 – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento II, sala 33, de segunda a sexta-feira, das 08h às 12h

Este termo está elaborado em três vias, rubricadas em todas as suas páginas e assinadas, ao seu término, pelo participante da pesquisa e pelo pesquisador, sendo uma das vias entregue ao participante, a 2ª via entregue ao pesquisador e a 3ª via ficará guardada na Maternidade.

Eu, _____, fui informado e concordo em participar, voluntariamente, do projeto de pesquisa acima descrito.

São José dos Campos, _____ de _____ de _____

Nome e assinatura do participante

Nome e assinatura do pesquisador

Testemunha

Testemunha

APÊNDICE B

	NOME	ÁREA TOTAL DA FOTO (µm ²)	ÁREA TOTAL DA MEDULA (µm ²)	ÁREA DE TECIDO (µm ²)	ÁREA SEM PREENCHIMENTO (µm ²)	PROPORÇÃO ÁREA TOTAL/SEM PREENCHIMENTO (%)	MÉDIA POR ANIMAL (%)
CONTROLE	CII-II-1-2	6429652.61	4804882.27	4404601.73	477549.61	9.94	13.71
	CII-II-7-2	6040141.47	4526421.79	3826346.88	791194.39	17.48	
	CII-III-2-2	5970306.41	4342787.18	3319499.41	322559.22	7.43	12.13
	CII-III-3-4	5511610.32	3974666.46	3345613.80	669169.40	16.84	
	CII-IV-3-1	5569958.73	4171095.03	2553762.23	311397.62	7.47	9.27
	CII-IV-5-2	5681327.38	4257320.93	2952894.45	471585.45	11.08	
	CII-V-5-1	5168628.81	3689284.30	2869958.02	569259.14	15.43	15.51
	CII-V-5-2	4820686.58	3602514.27	2639546.47	561828.68	15.60	
CII-VI-3-5	4895595.43	3668494.54	2685818.16	338319.01	9.22	9.22	
LESÃO I	LI-I-4-3	9140659.45	5027153.17	2255681.50	3481415.00	69.25	52.18
	LI-I-6-2	9393302.33	6034470.57	3307874.95	3626137.71	60.09	
	LI-I-9-3	10710872.58	6077209.00	3253155.21	3535057.10	58.17	
	LI-I-13-2	7660926.28	5656916.02	3699039.66	2276923.51	40.25	
	LI-I-16-3	5099553.39	3316372.46	2101991.35	1098822.01	33.13	
	LI-II-1-1	6520719.09	4882596.53	2647835.52	1681327.38	34.44	46.11
	LI-II-4-5	5285495.22	3713158.60	2536781.33	1287802.45	34.68	
	LI-II-7-1	5236729.04	3523033.38	1705555.01	1607679.91	45.63	
	LI-II-10-4	6225161.12	3904230.74	2475896.04	1309638.05	33.54	
	LI-II-12-1	6623908.22	4143330.60	1992993.53	2015401.52	48.64	
	LI-II-15-1	5113315.48	3462215.22	2476242.30	1114008.00	32.18	64.49
	LI-II-18-4	5150319.41	3513535.95	1679772.74	1938001.72	55.16	
	LI-II-20-4	6530986.77	4245138.22	2390995.11	3592048.73	84.62	
	LI-III-2-1	5927709.31	3907809.94	2385112.22	3420370.71	87.53	
	LI-III-4-1	7169370.80	4688418.65	5249169.68	3662452.65	78.12	
	LI-III-5-2	7651464.19	5014444.00	3446679.43	3474740.66	69.29	64.49
	LI-III-7-3	5697439.09	3914798.74	2290152.07	1724450.93	44.05	
	LI-III-9-4	6461091.64	4274651.62	1769104.39	3049278.51	71.33	
	LI-III-13-2	4588116.20	3179592.54	2015362.65	2465504.69	77.54	
	LI-III-16-5	54969755.22	35326523.55	19852178.61	16650679.80	47.13	
	LI-III-18-3	3690584.54	2491424.76	2065591.61	931518.18	37.39	56.92
	LI-III-21-1	48761320.59	36327226.67	25185199.84	23744799.03	65.36	
	LI-III-22-3	3678726.89	2677027.39	2069803.27	1796391.83	67.10	
	LI-IV-1-1	7055550.06	4827590.59	3428620.89	2821237.77	58.44	
	LI-IV-4-3	6396199.62	3946509.84	2607789.45	2541671.38	64.40	
	LI-IV-7-4	7718949.63	4433192.94	2860757.39	2913971.96	65.73	56.92
	LI-IV-9-4	4909679.04	3203791.90	2399623.35	1843744.70	57.55	
	LI-IV-13-5	5458724.35	3729090.11	2163950.76	1763334.56	47.29	
	LI-IV-15-4	4414448.95	3177076.86	2511066.20	1961466.17	61.74	
	LI-IV-16-3	4983577.36	3576795.61	2544603.99	1604369.24	44.85	
	LI-IV-18-4	5855598.82	4228549.52	3170526.17	2340041.83	55.34	49.95
	LI-VI-1-1	6261889.45	4582572.50	3528555.88	3498908.22	76.35	
LI-VI-4-1	6556956.30	4452576.46	2396648.34	1935680.37	43.47		
LI-VI-6-4	4178324.10	2907378.88	1559464.92	1525983.66	52.49		
LI-VI-9-6	4092949.71	2996184.07	1478443.52	1631384.62	54.45		
LI-VI-12-1	4086081.04	2900722.20	1538745.83	1497138.05	51.61	49.95	
LI-VI-15-3	4393196.34	3082399.37	1889239.08	1085416.78	35.21		
LI-VI-16-2	4769213.92	3345218.07	2158686.19	1350394.31	40.37		
LI-VI-18-5	4829272.43	3432761.89	2073802.93	1566079.20	45.62		
LII-V-1-1	7555853.92	5514853.86	3999240.35	1767669.88	32.05		45.27
LII-V-4-2	6028746.68	4395545.96	2642768.81	2031053.9	46.21		
LII-V-5-4	8841412.74	4995329.02	2965699.02	2363827.8	47.32		
LII-V-6-1	10715501.16	5647263.13	3429271.02	2705304.14	47.90		
LII-V-10-4	5353885.18	4198813.53	2704021.57	1827290.27	43.52		
LII-V-13-4	5958204.96	4383518.71	2890316.72	1860704.39	42.45		
LII-V-15-3	5604719.03	4192884.7	2572742.95	2837367.15	67.67		
LII-V-16-1	6231128.81	4629126.86	2962257.62	1961204.7	42.37		
LII-V-17-1	6234022.56	4646860.34	3168381.48	1762769.24	37.93		
LII-VI-0-2	8269153.85	6233185.17	2680002.4	4090540.02	65.63	53.03	
LII-VI-1-2	8087610.94	5833575.95	1732884.84	4296271.69	73.65		
LII-VI-5-3	6126953.9	4482633.98	2330756.4	2403495.82	53.62		
LII-VI-6-2	5902425.24	4177377.18	2303179.24	2443768.02	58.50		

	LII-VI-10-2	5046398.89	3778266.15	2395249.17	1606344.34	42.52	
	LII-VI-12-4	5752854.88	4312054.81	3060906.5	1659686.1	38.49	
	LII-VI-15-3	6272203.06	4665427.67	2802242.92	2530704.11	54.24	
	LII-VI-16-2	7299578.83	4875074.2	3125420.46	2068994.15	42.44	
	LII-VI-18-3	6064340.83	4502876.08	2898015.72	2170162.25	48.20	
	LII-VII-1-4	8534244.45	6450679.09	4490057.38	3261967.18	50.57	
	LII-VII-5-4	6426469.13	4632161.94	3404743.06	1677182.85	36.21	
	LII-VII-7-2	5919780.65	3991347.02	2154767.79	2037063.99	51.04	
	LII-VII-10-2	6186387.02	4383232.52	2116339.96	3365566.17	76.78	
	LII-VII-13-2	5880056.11	4388928.15	2851486.09	1735435.86	39.54	49.56
	LII-VII-15-2	5917024.7	4394432.98	2940930.8	2390493.39	54.40	
	LII-VII-16-2	6101440.16	4477945.33	2930514.73	1914049.69	42.74	
	LII-VII-18-2	6140426.25	4500749.05	2670250.58	2033258.66	45.18	
	LII-VIII-1-2	5096408.79	3446425.04	2329237.1	1020810.96	29.62	
	LII-VIII-5-3	4835787.78	3525754	1613082.28	1989435.52	56.43	
	LII-VIII-7-2	6177921.31	4170625.11	1749438.21	2499788	59.94	
	LII-VIII-10-3	6005451.83	4455385.41	1887475.97	2640316.72	59.26	
	LII-VIII-13-4	6812708.46	4777665.5	2484757.48	2418452.15	50.62	49.04
	LII-VIII-15-3	5117555.4	3309040.93	1212918.34	2140772.51	64.69	
	LII-VIII-16-1	5689680.03	3972723.16	2122088.59	1925833.14	48.48	
	LII-VIII-18-3	7507306.8	5321425.04	2210819.58	3229132.51	60.68	
	LII-VIII-20-2	6983110.97	5035488.16	3575067.84	1605376.22	31.88	
	LII-VIII-21-1	7579138.16	5587678.08	4130374.1	1607725.85	28.77	
	LII-IX-2-4	5970543.13	4401594.92	2131550.68	2340352.76	53.17	
	LII-IX-5-4	4952738.99	3548193.79	1982701.11	1658990.05	46.76	
	LII-IX-7-5	5722292.1	3949534.32	1970299.34	2066619.79	52.33	
	LII-IX-10-4	6814330.23	5040060.21	2062609.53	3043727.74	60.39	
	LII-IX-13-3	5154644.13	3761518.46	1210176.52	2601740.49	69.17	
	LII-IX-15-2	4161470.41	2879098.59	919618.12	1991650.88	69.18	
	LII-IX-16-3	3915685.6	2809048	862280.23	1984870.54	70.66	
	LII-IX-19-2	7576855.67	4957459.44	2166385.18	2856386.74	57.62	
	LII-IX-20-3	7323704	5126950.36	2172384.67	3026934.11	59.04	
	LII-IX-21-4	8391196.51	6028061.22	2783778.05	3348892.67	55.56	59.39
PBM I	PBMI-I-1-1	4416021.26	3273093.45	1694987	1578106.45	48.21	
	PBMI-I-5-4	5683885.47	4152775.03	2743696.65	1605895.61	38.67	
	PBMI-I-6-3	5795533.24	4111679.57	3385052.15	870385.55	21.17	
	PBMI-I-9-1	5801271.27	4112895.02	3187394	1109877.61	26.99	
	PBMI-I-12-4	4635691.67	3438563.51	2656262.37	931733.7	27.10	33.02
	PBMI-I-15-2	4914364.15	3349588.73	2183839.53	1315976.74	39.29	
	PBMI-I-16-4	4471705.58	2914975.41	2176522.13	843875.43	28.95	
	PBMI-I-17-4	4343515.04	2962303.55	2067128.58	1002045.76	33.83	
	PBMI-III-1-5	5706056.73	4242237.41	2655446.18	988096.42	23.29	
	PBMI-III-5-1	5086063.37	3407223.42	2572520.35	969437.22	28.45	
	PBMI-III-6-3	5599065.8	3773573.97	2633126.52	1269054.92	33.63	
	PBMI-III-10-2	5763327.49	4322675.82	2677324.18	1792222.57	41.46	
	PBMI-III-13-1	7012408.84	5113043.42	4446396.77	778142.49	15.22	26.16
	PBMI-III-15-4	7924416.3	5537286.59	4670586.24	917409.83	16.57	
	PBMI-III-16-1	7010840.07	4518436.6	3754589.72	1194704.34	26.44	
	PBMI-III-18-2	7251787.83	5142708.75	4090444.63	1244714.23	24.20	
	PBMI-IV-1-3	4121290.07	2965681.36	2463575.53	1735916.39	58.53	
	PBMI-IV-4-3	5329427.89	4102157.41	3614901.92	600846.57	14.65	
	PBMI-IV-7-2	6300285.49	4618951.04	3082459.44	1672985.33	36.22	
	PBMI-IV-9-3	6080950.73	4248682.09	3322121.09	1065934.34	25.09	
	PBMI-IV-12-2	6346811.58	4228235.06	3027248.57	1363810.14	32.25	31.67
	PBMI-IV-15-2	5854224.38	3977295.21	2727994.8	1401022.53	35.23	
	PBMI-IV-16-2	5206367.66	3457063.71	2557482.76	995374.95	28.79	
	PBMI-IV-18-3	4683684.07	3403153.09	2805147.27	768450.73	22.58	
	PBMI-V-2-5	4487605.29	3351786.42	2486347.45	980651.82	29.26	
	PBMI-V-5-5	5611453.45	4114124.6	2473320.28	1801264.2	43.78	
	PBMI-V-7-2	6433217.68	4792105.97	3221486.52	1833424.02	38.26	
	PBMI-V-9-4	7475790.04	5338331.73	4229966.36	1320160.13	24.73	
	PBMI-V-12-5	6745304.29	4793890.27	3288406.64	1722461.7	35.93	34.33
	PBMI-V-15-4	5747067.39	4138857.48	2590395.16	1673395.19	40.43	
	PBMI-V-16-5	4970370	3450159.7	2661625.87	864347.19	25.05	
	PBMI-V-17-3	5768867.66	4089596.64	2713642.66	1522531.66	37.23	
PBMI-VI-2-2	4551175.87	3243958.11	1838193.93	1488456.81	45.88		
PBMI-VI-4-2	5822714.68	4063655.38	2031449.63	2113386.14	52.01		
PBMI-VI-6-5	6573492	4756508.28	2798522.39	2072972.61	43.58		
PBMI-VI-9-3	5924529.37	4375522.92	2818810.42	1674638.9	38.27	41.59	
PBMI-VI-12-2	5765730.11	4389154.28	2970917.66	1561302.22	35.57		
PBMI-VI-15-2	6769390.58	4727613.21	2823523.8	2098864.41	44.40		
PBMI-VI-16-2	6825979.42	4724125.87	3631236.22	1228273.93	26.00		

	PBMI-VI-17-4	6709077.68	4659382.24	2672815.73	2189672.96	46.99	
PBM II	PBMII-IV-0-2	5376158.91	3880144.44	2597535.9	1447103.43	37.30	41.27
	PBMII-IV-1-2	5145542.43	3748837.55	2515079.99	1417710.16	37.82	
	PBMII-IV-4-1	4200322.23	2847157.84	1633621.18	1414325.29	49.67	
	PBMII-IV-7-4	3875491.12	2695831.45	1894736.84	1065754.14	39.53	
	PBMII-IV-9-3	4077852.05	2901262.79	1994138.31	1184012.66	40.81	
	PBMII-IV-13-4	4572446.15	3060259.91	1786523.4	1504303.52	49.16	
	PBMII-IV-15-4	4638097.83	2975507.38	2253519.14	1022273.73	34.36	
	PBMII-IV-16-3	4200096.1	2919646.39	2119562.3	941224.07	32.24	
	PBMII-IV-17-2	4500872.72	3006176.15	1623367.63	1519888.77	50.56	
	PBMII-V-0-1	4713370.6	3507239.67	1952975.72	1767871.28	50.41	47.83
	PBMII-V-1-3	4222603.03	3269623.78	2048285.66	1413788.23	43.24	
	PBMII-V-5-4	4322442.62	3044741.79	2000106	1271651.87	41.77	
	PBMII-V-7-4	4067676.24	2908915.85	1995265.42	1069029.48	36.75	
	PBMII-V-10-3	4224588.73	2959568.8	1377441.49	1955512.61	66.07	
	PBMII-V-13-1	5376816.1	3731256.01	2327523.46	1652937.56	44.30	
	PBMII-V-15-5	5010288.88	3824559.05	1356153.54	2541250.92	66.45	
	PBMII-V-16-4	6130702.7	4519782.77	3188736.64	1583929.28	35.04	
	PBMII-V-18-3	5419151.73	3979284.44	2293720.67	1847016.51	46.42	
	PBMII-VI-1-2	7634995.62	5370717.68	3270938.15	2188323.25	40.75	42.63
	PBMII-VI-4-2	6733951.89	4984195.69	2733255.84	2363237.75	47.41	
PBMII-VI-6-3	6649980.21	4815075.75	3266313.1	1625480.52	33.76		
PBMII-VI-10-2	5401662.05	4059532.05	2063810.84	2049380.97	50.48		
PBMII-VI-13-2	4538184.04	3217850.78	1843472.64	1423010.06	44.22		
PBMII-VI-15-3	5806094.18	4069192.01	2197958.48	1936726.21	47.59		
PBMII-VI-16-4	6360838.66	4419148.2	2714193.85	1809630.99	40.95		
PBMII-VI-18-4	5328251.31	3990340.04	2628201.14	1430680.79	35.85		
PBMII-VII-2-1	6710773.64	4661216.01	3266627.57	1502702.95	32.24	32.14	
PBMII-VII-5-1	5039074.42	3681595.91	2627342.56	1192361.78	32.39		
PBMII-VII-7-1	4269334.05	3188658.91	2099461.53	1169759.46	36.68		
PBMII-VII-10-3	4235767.99	3060542.57	2155230.65	966677.74	31.59		
PBMII-VII-12-1	4185411.84	3010045.08	2081480.72	985962.32	32.76		
PBMII-VII-15-2	4299282.04	3053557.3	2200884.02	899432.56	29.46		
PBMII-VII-16-3	4268337.67	3139348.61	2195993.98	1017118.69	32.40		
PBMII-VII-18-4	4702661.26	3363661.74	2433323.68	996399.6	29.62		
PBMII-VIII-1-4	4935722.77	3629943.04	2512560.77	1203820.17	33.16	34.11	
PBMII-VIII-5-5	4923250.33	3482241.79	2485690.26	1078844.9	30.98		
PBMII-VIII-6-1	4025383.01	2953954.43	1940248.88	1108612.7	37.53		
PBMII-VIII-9-2	4459999.86	3283746.25	2155159.99	1196693.57	36.44		
PBMII-VIII-12-4	5132214.94	3691312.4	2759723.56	1033166.8	27.99		
PBMII-VIII-15-3	4989096.33	3646284.41	2573184.61	1248830.49	34.25		
PBMII-VIII-16-1	4992308.07	3642228.22	2432977.42	1371116.94	37.65		
PBMII-VIII-18-4	4980510.49	3505490.7	2448972.53	1155940.84	32.98		
PBMII-VIII-20-2	5579767.09	3960943.24	2634949.69	1426190.01	36.01		
MAI	MAI-I-1-4	7626561.71	5629607.38	3870180.62	1755345.84	31.18	37.76
	MAI-I-5-2	7652213.24	5420360.11	4203131.18	1376950.36	25.40	
	MAI-I-7-1	8592840.18	6192909.44	3940969.67	2452286.73	39.60	
	MAI-I-10-1	8498417.1	5836384.9	4500688.99	1504900.64	25.78	
	MAI-I-12-1	6437468.2	4709943.33	2492488.27	2292770.22	48.68	
	MAI-I-15-1	7083003.56	5049628.3	2866548.42	2292582.96	45.40	
	MAI-I-16-3	9015037.59	6518019.67	3710731.25	2954721.15	45.33	
	MAI-I-17-4	7445940.98	5369742.5	3902170.84	1566171.07	29.17	
	MAI-I-18-2	7749455.88	5990382.44	3228256.26	2953138.25	49.30	
	MAI-II-1-3	5411696.53	3983428.97	1978090.2	2089769.77	52.46	43.32
	MAI-II-4-1	6784650.77	4780061.05	2716893.27	2245738.88	46.98	
	MAI-II-7-4	7271404.55	5532746.34	3500127.2	2148782.44	38.84	
	MAI-II-10-3	7848942.14	5996979.05	2784343.38	1393192.8	23.23	
	MAI-II-13-2	7173094.86	5159226.78	3016178.84	2271252.61	44.02	
	MAI-II-15-2	8606821.33	5747530.24	2713483.66	3175112.36	55.24	
	MAI-II-16-1	8872039.12	6365559.1	4065248.88	2457773.9	38.61	
	MAI-II-17-4	8549126.58	6192962.43	3420928.97	2923469.39	47.21	
	MAI-III-2-6	6581463.06	4550939.14	2179726.81	2462098.62	54.10	47.69
	MAI-III-5-3	4932217.76	3617580.13	1876141.25	1869304.37	51.67	
	MAI-III-7-2	4185482.5	2962268.22	1677914.24	1329155.83	44.87	
MAI-III-9-2	4307178.9	2996321.87	1627257.76	1419589.86	47.38		
MAI-III-13-5	4091356.21	3028771.41	1870488.02	960582.85	31.72		
MAI-III-15-2	4974376.73	3564814.29	1901400.59	1741520.15	48.85		
MAI-III-16-3	5692690.37	4164116.82	1990283.51	2261801.12	54.32		
MAI-III-18-1	6399368.96	4691891.85	2324502.52	2281714.62	48.63		
MAI-V-2-7	8248505.43	5935620.3	2787604.58	3259924.95	54.92	46.23	
MAI-V-4-3	6773248.91	5036965.06	2957360.51	2254020.86	44.75		
MAI-V-6-2	6938846.18	4278195.49	2713405.93	1663682.23	38.89		

	MA+PBMI-II-10-4	5132267.93	3682903.22	2562704.93	1211533.3	32.90	
	MA+PBMI-II-12-3	6512479.51	4046469.56	2395425.83	1740813.5	43.02	
	MA+PBMI-II-15-2	5199205.72	3488591.07	1952548.19	1616329.36	46.33	
	MA+PBMI-II-16-2	7147966.25	5274460.82	2708501.75	2739015.07	51.93	
	MA+PBMI-II-18-2	7220278.14	5134243.03	2637232.18	2666226.19	51.93	
	MA+PBMI-III-2-2	5969567.95	4162615.18	2364241.2	1899831.82	45.64	
	MA+PBMI-III-5-1	5750586.52	4117343.41	2465635.42	1756681.41	42.67	
	MA+PBMI-III-7-3	6196545.17	4617089.01	2962706.34	1755105.57	38.01	
	MA+PBMI-III-9-1	6473546.41	4787314.86	2878201.14	2031174.03	42.43	
	MA+PBMI-III-12-2	5360287.47	3860397	2133946.24	1790862.26	46.39	
	MA+PBMI-III-15-2	4334558.2	3108715.16	1399835.35	1759603.43	56.60	45.14
	MA+PBMI-III-18-3	6388963.48	4410491.69	2113319.01	2361259.12	53.54	
	MA+PBMI-III-19-2	6274626.89	4513822.15	2886327.66	1789918.88	39.65	
	MA+PBMI-III-20-4	6552186.39	4824315.25	3013889.28	1900955.4	39.40	
	MA+PBMI-III-21-5	6033993.58	4549988.69	2513062.5	2142429.62	47.09	
	MA+PBMI-IV-2-3	6260387.81	4321202.44	2160551.76	2312012.41	53.50	
	MA+PBMI-IV-5-1	6513391.09	4183599.27	2019765.11	2258267.85	53.98	
	MA+PBMI-IV-6-4	4928052.04	3334335.6	1638740.88	1751950.36	52.54	
	MA+PBMI-IV-10-3	3616460.09	2595433.6	1680557.13	964130.25	37.15	45.08
	MA+PBMI-IV-13-1	4991944.15	3454007.43	1721680.85	1812881.59	52.49	
	MA+PBMI-IV-15-3	5914473.68	4096437.05	2417614.76	1753194.08	42.80	
	MA+PBMI-IV-16-1	5858301.77	4269570.78	2456293.46	1896507.01	44.42	
	MA+PBMI-IV-17-2	7294787.72	4860934.06	3793787.81	1153944.54	23.74	
	MA+PBMI-V-2-3	5492778	3884578.69	2655757.11	1326887.47	34.16	
	MA+PBMI-V-5-3	6125756.12	3863453.28	3029018.74	918628.81	23.78	
	MA+PBMI-V-7-1	5649005.03	3537622.25	1972012.97	1654637.06	46.77	
	MA+PBMI-V-9-1	5101906.55	3581791.65	2515634.72	1002964.41	28.00	
	MA+PBMI-V-12-2	6080049.75	3683094.01	2194711.4	1556822.04	42.27	31.37
	MA+PBMI-V-15-3	5578297.25	3635776.47	2789777.55	906848.89	24.94	
	MA+PBMI-V-16-2	5633932.1	3784004.18	2886521.99	980623.55	25.91	
	MA+PBMI-V-18-3	5420999.63	3625692.52	2773715.3	910855.62	25.12	
PBM+AM II	MA+PBMII-II-2-4	6023294.84	4127911.41	2845935.33	1463794.59	35.46	
	MA+PBMII-II-4-4	6039332.35	4214282.18	3019860.51	1297914.66	30.80	
	MA+PBMII-II-6-5	5510967.27	4174130.11	2706922.38	1571354.37	37.65	
	MA+PBMII-II-10-3	6150771.67	4441563.26	2953700.04	1553705.69	34.98	38.55
	MA+PBMII-II-13-2	5631465.88	4308023.35	2612948.02	1783315.2	41.40	
	MA+PBMII-II-15-2	6693121.43	4985026	3235135.54	1928037.9	38.68	
	MA+PBMII-II-16-1	7675744.81	5110181.47	3429309.88	1773128.78	34.70	
	MA+PBMII-II-18-3	6246198.2	4466797.87	2110566.6	2446820.76	54.78	
	MA+PBMII-III-2-3	5290413.53	3913664.57	2436648.48	1558277.74	39.82	
	MA+PBMII-III-5-3	5127353.16	3946531.04	2151831.65	1891807.76	47.94	
	MA+PBMII-III-7-3	5568432.36	4108930.69	2276958.84	1914590.28	46.60	
	MA+PBMII-III-10-2	5688249.05	4087886.54	2236895.1	1979747.3	48.43	44.75
	MA+PBMII-III-13-5	5424812.03	3836494.43	2223171.89	1678772.82	43.76	
	MA+PBMII-III-15-3	5417858.56	3687256.2	2196333.17	1578781.3	42.82	
	MA+PBMII-III-16-1	5219999.01	3630674.43	2120088.76	1632313.87	44.96	
	MA+PBMII-III-18-4	4945541.72	3463536.66	2046363.56	1513779.75	43.71	
	MA+PBMII-IV-2-2	5486103.65	3606877.86	2358001.44	1248876.42	34.62	
	MA+PBMII-IV-5-3	6489838.32	4724200.07	2699378.85	2168833.74	45.91	
	MA+PBMII-IV-7-2	7011200.46	5095189.81	3165190.94	2105351.49	41.32	
	MA+PBMII-IV-9-1	7275623.27	4903305.02	3354662.5	1742364.61	35.53	41.52
	MA+PBMII-IV-13-3	4948633.33	3325428.23	1541328.65	1863612.27	56.04	
	MA+PBMII-IV-15-3	4976228.16	3112502.83	1867495.34	1323262.34	42.51	
	MA+PBMII-IV-16-2	4118707.25	2695107.13	1620056.96	1142620.41	42.40	
	MA+PBMII-IV-17-1	3981796.6	2739718.19	1879780.51	927575.05	33.86	
	MA+PBMII-VI-2-1	6558977.33	4323499.07	3560606.17	953897.9	22.06	
	MA+PBMII-VI-5-4	5634631.69	4282050.29	1977609.67	2472507.63	57.74	
	MA+PBMII-VI-6-2	5705099.21	4286011.08	2385451.41	2017790.01	47.08	
	MA+PBMII-VI-10-3	5476461.36	4260472.61	2124307.48	2264949.26	53.16	43.35
	MA+PBMII-VI-13-2	6268959.52	4782944.2	3396499.94	1580212.28	33.04	
	MA+PBMII-VI-15-4	5668720.67	4383412.71	2424066.51	2070909.18	47.24	
	MA+PBMII-VI-16-3	6531007.97	4501056.45	2710392.05	1952770.79	43.38	
	MA+PBMII-VI-18-5	6298829.78	4348938.61	2570516.99	1873710.36	43.08	
	MA+PBMII-VII-1-2	4446718.3	3343292.44	2054136.75	1444714.94	43.21	
	MA+PBMII-VII-5-2	5097447.57	3567496.04	2106863.73	1553882.36	43.56	
	MA+PBMII-VII-7-3	5240481.37	3705502.01	3297649.67	486170.78	13.12	
	MA+PBMII-VII-10-2	5286802.53	3717334.93	2592447.99	1233012.04	33.17	38.48
	MA+PBMII-VII-12-3	4876335.58	3463518.99	2199060.86	1434881.85	41.43	
	MA+PBMII-VII-15-1	4886479.59	3488290.75	2106708.27	1511762.25	43.34	
	MA+PBMII-VII-16-1	6166374.58	4257494.06	2485227.4	2054196.82	48.25	
	MA+PBMII-VII-17-4	5925801.35	4236909.24	2717073.46	1769726.24	41.77	

APÊNDICE C

FRS 7 (N) - DAY 0						FRS 7 (N) - DAY 3					
TIME(s)	CTLR	INJURY	PBM	AM	PBM+AM	TIME(s)	CTLR	INJURY	PBM	AM	PBM+AM
0.15	0.0172	0.0000	0.0021	0.0335	0.0234	0.15	0.0091	0.0105	0.0078	0.0338	0.0117
0.30	0.0180	0.0000	0.0025	0.0333	0.0234	0.30	0.0088	0.0105	0.0079	0.0339	0.0114
0.45	0.0180	0.0299	0.0027	0.0385	0.0235	0.45	0.0089	0.0104	0.0078	0.0340	0.0118
0.60	0.0182	0.0297	0.0028	0.0427	0.0235	0.60	0.0093	0.0104	0.0148	0.0339	0.0121
0.75	0.0178	0.0317	0.0027	0.0355	0.0239	0.75	0.0094	0.0104	0.0636	0.0340	0.0153
0.90	0.0176	0.0744	0.0034	0.0492	0.0236	0.90	0.0088	0.0104	0.1255	0.0341	0.0182
1.05	0.0182	0.0299	0.0095	0.0555	0.0275	1.05	0.0090	0.0105	0.0543	0.0342	0.0177
1.20	0.0183	0.0297	0.0881	0.0731	0.0810	1.20	0.0081	0.0100	0.0674	0.0343	0.0172
1.35	0.0178	0.0317	0.0786	0.0905	0.1738	1.35	0.0082	0.0315	0.1081	0.0329	0.1288
1.50	0.0411	0.0744	0.1508	0.0980	0.1394	1.50	0.0074	0.1700	0.2032	0.0329	0.3819
1.65	0.1254	0.0252	0.2311	0.1138	0.1056	1.65	0.0130	0.3674	0.3446	0.0333	0.5796
1.80	0.1994	0.0847	0.2869	0.1407	0.2847	1.80	0.0917	0.5063	0.5013	0.0341	0.7537
1.95	0.2673	0.0751	0.3993	0.1322	0.4114	1.95	0.1710	0.5489	0.4314	0.0577	0.7479
2.10	0.3330	0.0847	0.4432	0.1124	0.5819	2.10	0.2124	0.5989	0.4268	0.1786	0.8732
2.25	0.3791	0.0751	0.5345	0.1164	0.4960	2.25	0.2967	0.5890	0.3248	0.1218	0.9838
2.40	0.6063	0.0498	0.5908	0.1003	0.3837	2.40	0.3935	0.5418	0.3273	0.1775	0.9491
2.55	0.7510	0.0261	0.7113	0.0877	0.2964	2.55	0.4367	0.5405	0.3480	0.1792	0.9374
2.70	0.8712	0.1587	0.7685	0.0883	0.3994	2.70	0.5056	0.5938	0.3084	0.1941	0.9185
2.85	0.9836	0.1087	0.8553	0.0877	0.5532	2.85	0.5672	0.6392	0.3804	0.3323	0.9172
3.00	1.0164	0.1521	0.9181	0.0990	0.5937	3.00	0.5954	0.7251	0.4037	0.3194	0.7890
3.15	1.0604	0.1711	0.8900	0.1734	0.6509	3.15	0.5932	0.7579	0.4894	0.4341	0.7964
3.30	1.0255	0.1653	0.8539	0.1993	0.7799	3.30	0.6074	0.8237	0.5794	0.5582	0.7603
3.45	1.1369	0.2169	0.8277	0.2149	0.7761	3.45	0.7011	0.8899	0.4183	0.5165	0.8064
3.60	1.1819	0.3538	0.8641	0.2171	0.7747	3.60	0.7357	0.9591	0.4290	0.5073	0.9180
3.75	1.1903	0.3569	0.9535	0.2527	0.9420	3.75	0.7679	1.0383	0.3530	0.7028	0.9412
3.90	1.0150	0.4848	0.9615	0.2939	0.9577	3.90	0.6890	1.0690	0.3662	0.8155	0.9166
4.05	0.9132	0.5948	1.0322	0.3036	1.0003	4.05	0.6735	1.0891	0.3354	0.8498	0.9925
4.20	0.7458	0.6781	1.1002	0.3292	1.0160	4.20	0.6639	1.1173	0.2950	0.8815	1.0211
4.35	0.6535	0.6953	1.1480	0.3690	1.0106	4.35	0.6496	1.2373	0.3281	0.9585	0.8842
4.50	0.5185	0.7395	1.2226	0.3819	0.9669	4.50	0.6226	1.4472	0.3238	1.0072	0.7828
4.65	0.4170	0.6773	1.2478	0.3851	0.9612	4.65	0.5158	1.4296	0.2796	1.0279	1.1713
4.80	0.3451	0.5947	1.1368	0.4445	0.9223	4.80	0.5237	1.4588	0.2540	1.0694	1.0754
4.95	0.2515	0.5984	1.0584	0.4643	0.8870	4.95	0.4998	1.5201	0.2384	1.1044	0.9936
5.10	0.2228	0.7178	1.0580	0.4377	0.9168	5.10	0.4460	1.5911	0.2732	1.0339	0.8360
5.25	0.2020	0.6732	1.0070	0.5356	0.9140	5.25	0.4027	1.5405	0.3770	1.0293	0.7629
5.40	0.1688	0.6931	1.0205	0.5492	0.9513	5.40	0.3753	1.4856	0.4678	1.0376	0.6889
5.55	0.1319	0.6467	0.9650	0.5525	0.9478	5.55	0.3412	1.5074	0.4945	1.0476	0.6155
5.70	0.1165	0.6936	0.9956	0.5692	0.9958	5.70	0.3264	1.4478	0.5412	1.0242	0.5476
5.85	0.1100	0.7588	0.9639	0.5824	0.9375	5.85	0.3149	1.3904	0.5976	1.0103	0.4829
6.00	0.1147	0.8092	0.9737	0.5796	0.9107	6.00	0.2958	1.4183	0.6782	0.9994	0.4079
6.15	0.0984	0.9365	0.9230	0.6472	0.8353	6.15	0.2668	1.3771	0.7267	1.0129	0.3853
6.30	0.0686	1.0211	0.8780	0.6363	0.7901	6.30	0.2320	1.3173	0.7601	0.9911	0.3148
6.45	0.0593	1.1419	0.7750	0.5974	0.7603	6.45	0.2350	1.3023	0.8093	0.9772	0.3179

6.60	0.0435	1.1210	0.7821	0.6255	0.7553	6.60	0.2331	1.2107	0.8334	0.8824	0.3221
6.75	0.0243	1.2401	0.8131	0.6321	0.6892	6.75	0.2243	1.1352	0.8813	0.8057	0.3382
6.90	0.0193	1.2093	0.7626	0.6562	0.6511	6.90	0.2278	1.1712	0.8762	0.7686	0.3234
7.05	0.0171	1.1870	0.7483	0.6658	0.6351	7.05	0.2237	1.0901	0.7540	0.7321	0.3329
7.20	0.0167	1.1362	0.7089	0.6870	0.4807	7.20	0.2336	1.0175	0.7994	0.6973	0.3298
7.35	0.0167	1.0012	0.6101	0.6679	0.4659	7.35	0.2442	0.9608	0.8144	0.6832	0.3300
7.50	0.0173	1.0575	0.5776	0.6735	0.4428	7.50	0.2575	0.8636	0.8106	0.7163	0.3228
7.65	0.0170	1.1384	0.5632	0.6729	0.4168	7.65	0.2545	0.7914	0.8307	0.7495	0.3750
7.80	0.0168	1.1528	0.5450	0.6525	0.3753	7.80	0.2447	0.7906	0.8172	0.7711	0.4292
7.95	0.0172	0.9789	0.5139	0.6583	0.2581	7.95	0.2336	0.7579	0.7672	0.7608	0.4501
8.10	0.0167	1.0042	0.4953	0.6741	0.2780	8.10	0.2341	0.7370	0.7193	0.7740	0.4612
8.25	0.0166	1.0356	0.4683	0.6944	0.2084	8.25	0.2335	0.7280	0.7015	0.7274	0.4663
8.40	0.0171	1.1020	0.4367	0.7134	0.1670	8.40	0.2323	0.7156	0.6355	0.6488	0.4586
8.55	0.0176	1.0320	0.3883	0.7268	0.1141	8.55	0.2213	0.6327	0.6840	0.6184	0.4561
8.70	0.0175	0.9680	0.3331	0.7628	0.1026	8.70	0.2136	0.6389	0.6972	0.6377	0.4011
8.85	0.0171	0.8685	0.2973	0.8595	0.1028	8.85	0.1969	0.6194	0.6544	0.6104	0.3070
9.00	0.0000	0.9488	0.2394	0.9345	0.0601	9.00	0.1721	0.6018	0.5963	0.5712	0.3544
9.15	0.2924	0.8344	0.1993	0.9952	0.0566	9.15	0.1704	0.5744	0.5078	0.5706	0.3964
9.30	0.0000	0.7025	0.1461	1.0469	0.0195	9.30	0.1644	0.5703	0.5164	0.5519	0.3849
9.45	0.0000	0.6581	0.1288	1.0888	0.0127	9.45	0.1575	0.5446	0.3976	0.6014	0.3636
9.60	0.0000	0.5875	0.1240	1.1531	0.0140	9.60	0.1450	0.5435	0.3706	0.6984	0.3440
9.75	0.0000	0.5644	0.1010	1.1550	0.0127	9.75	0.1374	0.5457	0.3983	0.7419	0.3351
9.90	0.0000	0.5832	0.1064	1.1169	0.0136	9.90	0.1148	0.5478	0.3706	0.8143	0.3435
10.05	0.0000	0.6427	0.0704	1.1040	0.0136	10.05	0.1110	0.5379	0.3983	0.8190	0.3363
10.20	0.0000	0.7161	0.0709	1.0532	0.0069	10.20	0.1005	0.5478	0.3706	0.8073	0.3013
10.35	0.0000	0.7180	0.0348	1.0296	0.0066	10.35	0.0853	0.5379	0.3983	0.6959	0.3267
10.50	0.0000	0.8267	0.0458	1.0130	0.0066	10.50	0.0837	0.5478	0.3706	0.6182	0.2905
10.65	0.0000	0.7933	0.0517	0.9421	0.0069	10.65	0.0607	0.5379	0.3983	0.5956	0.2441
10.80	0.0000	0.8117	0.0471	0.8672	0.0063	10.80	0.0596	0.5874	0.2623	0.5432	0.2515
10.95	0.0000	0.8234	0.0346	0.8522	0.0067	10.95	0.0730	0.5942	0.2368	0.4520	0.2371
11.10	0.0000	0.7632	0.0339	1.0998	0.0088	11.10	0.0680	0.6040	0.2700	0.4201	0.2184
11.25	0.0000	0.7503	0.0287	1.1141	0.0000	11.25	0.0658	0.5995	0.2517	0.3626	0.1978
11.40	0.0000	0.7408	0.0397	1.0342	0.0000	11.40	0.0592	0.5995	0.2365	0.3354	0.1883
11.55	0.0000	0.7325	0.0326	0.9693	0.0000	11.55	0.0494	0.6071	0.2346	0.3607	0.1822
11.70	0.0000	0.7138	0.0387	0.8572	0.0000	11.70	0.0484	0.6091	0.2400	0.3591	0.1761
11.85	0.0000	0.7175	0.0268	0.8042	0.0000	11.85	0.0489	0.5935	0.2390	0.3402	0.1718
12.00	0.0000	0.5716	0.0243	0.7393	0.0000	12.00	0.0467	0.3994	0.2446	0.3010	0.1683
12.15	0.0000	0.5713	0.0295	0.6912	0.0000	12.15	0.0425	0.3885	0.2348	0.2631	0.1655
12.30	0.0000	0.5669	0.0380	0.6607	0.0000	12.30	0.0413	0.3265	0.1936	0.2368	0.1615
12.45	0.0000	0.5721	0.0334	0.6670	0.0000	12.45	0.0384	0.3476	0.1737	0.2235	0.1625
12.60	0.0000	0.4591	0.0284	0.6828	0.0000	12.60	0.0396	0.3508	0.1538	0.1535	0.1588
12.75	0.0000	0.4297	0.0285	0.7231	0.0000	12.75	0.0397	0.3589	0.2283	0.1680	0.1563
12.90	0.0000	0.5048	0.0266	0.8112	0.0000	12.90	0.0374	0.3508	0.2340	0.1672	0.1524
13.05	0.0000	0.4687	0.0269	0.8488	0.0000	13.05	0.0363	0.3464	0.2099	0.1731	0.1473
13.20	0.0000	0.4157	0.0379	0.8598	0.0000	13.20	0.0328	0.3914	0.2061	0.1664	0.1443
13.35	0.0000	0.3909	0.0347	0.8612	0.0000	13.35	0.0293	0.3921	0.2173	0.1270	0.1261
13.50	0.0000	0.3587	0.0314	0.8947	0.0000	13.50	0.0099	0.3795	0.2201	0.1259	0.1122
13.65	0.0000	0.3363	0.0319	0.8889	0.0000	13.65	0.0017	0.3961	0.2065	0.1215	0.1018

13.80	0.0000	0.3092	0.0302	0.7872	0.0000	13.80	0.0087	0.3627	0.2009	0.1014	0.0800
13.95	0.0000	0.3234	0.0288	0.6835	0.0000	13.95	0.0055	0.3450	0.1960	0.0950	0.0757
14.10	0.0000	0.3116	0.0276	0.6617	0.0000	14.10	0.0016	0.3453	0.1878	0.0897	0.0637
14.25	0.0000	0.2753	0.0262	0.6107	0.0000	14.25	0.0024	0.3394	0.1789	0.0892	0.0648
14.40	0.0000	0.1754	0.0230	0.5945	0.0000	14.40	0.0044	0.3373	0.1206	0.0873	0.0536
14.55	0.0000	0.1176	0.0246	0.5349	0.0000	14.55	0.0071	0.3343	0.0272	0.0785	0.0186
14.70	0.0000	0.0287	0.0199	0.5005	0.0000	14.70	0.0024	0.3323	0.0219	0.0749	0.0169
14.85	0.0000	0.0289	0.0182	0.4514	0.0000	14.85	0.0025	0.3271	0.0119	0.0962	0.0123
15.00	0.0000	0.0293	0.0164	0.3891	0.0000	15.00	0.0025	0.3209	0.0116	0.0940	0.0086
15.15	0.0000	0.0294	0.0124	0.3287	0.0000	15.15	0.0025	0.3140	0.0133	0.0803	0.0057
15.30	0.0000	0.0293	0.0174	0.2758	0.0000	15.30	0.0026	0.3085	0.0114	0.1026	0.0056
15.45	0.0000	0.0292	0.0219	0.2702	0.0000	15.45	0.0026	0.3008	0.0049	0.1773	0.0059
15.60	0.0000	0.0000	0.0399	0.2188	0.0000	15.60	0.0024	0.2941	0.0028	0.1973	0.0034
15.75	0.0000	0.0000	0.0316	0.1664	0.0000	15.75	0.0000	0.2790	0.0047	0.1116	0.0030
15.90	0.0000	0.0000	0.0215	0.1409	0.0000	15.90	0.0000	0.2636	0.0077	0.1041	0.0089
16.05	0.0000	0.0000	0.0223	0.1221	0.0000	16.05	0.0000	0.2527	0.0113	0.1199	0.0083
16.20	0.0000	0.0000	0.0649	0.1072	0.0000	16.20	0.0000	0.2460	0.0091	0.1877	0.0069
16.35	0.0000	0.0000	0.0379	0.1207	0.0000	16.35	0.0000	0.2477	0.0099	0.2080	0.0067
16.50	0.0000	0.0000	0.0330	0.1243	0.0000	16.50	0.0000	0.2322	0.0107	0.2214	0.0073
16.65	0.0000	0.0000	0.0216	0.1304	0.0000	16.65	0.0000	0.2159	0.0088	0.2203	0.0073
16.80	0.0000	0.0000	0.0204	0.1496	0.0000	16.80	0.0000	0.2088	0.0079	0.1806	0.0075
16.95	0.0000	0.0000	0.0256	0.1533	0.0000	16.95	0.0000	0.1968	0.0092	0.1750	0.0066
17.10	0.0000	0.0000	0.0210	0.1993	0.0000	17.10	0.0000	0.1783	0.0113	0.1679	0.0072
17.25	0.0000	0.0000	0.0077	0.2135	0.0000	17.25	0.0000	0.1672	0.0071	0.1600	0.0073
17.40	0.0000	0.0000	0.0083	0.2336	0.0000	17.40	0.0000	0.1766	0.0068	0.1596	0.0065
17.55	0.0000	0.0000	0.0102	0.2276	0.0000	17.55	0.0000	0.1863	0.0058	0.2154	0.0053
17.70	0.0000	0.0000	0.0387	0.2405	0.0000	17.70	0.0000	0.1932	0.0052	0.2124	0.0034
17.85	0.0000	0.0000	0.0027	0.2407	0.0000	17.85	0.0000	0.2334	0.0014	0.2062	0.0000
18.00	0.0000	0.0000	0.0023	0.3187	0.0000	18.00	0.0000	0.2212	0.0025	0.2311	0.0000
18.15	0.0000	0.0000	0.0007	0.2979	0.0000	18.15	0.0000	0.2068	0.0034	0.0861	0.0000
18.30	0.0000	0.0000	0.0000	0.2921	0.0000	18.30	0.0000	0.2088	0.0023	0.0710	0.0000
18.45	0.0000	0.0000	0.0000	0.2921	0.0000	18.45	0.0000	0.1958	0.0040	0.0710	0.0000
18.60	0.0000	0.0000	0.0000	0.2876	0.0000	18.60	0.0000	0.1938	0.0013	0.0167	0.0000
18.75	0.0000	0.0000	0.0000	0.2700	0.0000	18.75	0.0000	0.2239	0.0053	0.1054	0.0000
18.90	0.0000	0.0000	0.0000	0.2616	0.0000	18.90	0.0000	0.2034	0.0049	0.0995	0.0000
19.05	0.0000	0.0000	0.0000	0.2581	0.0000	19.05	0.0000	0.1805	0.0058	0.0972	0.0000
19.20	0.0000	0.0000	0.0000	0.2482	0.0000	19.20	0.0000	0.2175	0.0073	0.1534	0.0000
19.35	0.0000	0.0000	0.0000	0.2476	0.0000	19.35	0.0000	0.2165	0.0096	0.1466	0.0000
19.50	0.0000	0.0000	0.0000	0.2475	0.0000	19.50	0.0000	0.1870	0.0139	0.1343	0.0000
19.65	0.0000	0.0000	0.0000	0.2524	0.0000	19.65	0.0000	0.1837	0.0041	0.1289	0.0000
19.80	0.0000	0.0000	0.0000	0.2365	0.0000	19.80	0.0000	0.1812	0.0030	0.1252	0.0000
19.95	0.0000	0.0000	0.0000	0.2361	0.0000	19.95	0.0000	0.1428	0.0020	0.1153	0.0000
20.10	0.0000	0.0000	0.0000	0.2318	0.0000	20.10	0.0000	0.1166	0.0014	0.1122	0.0000
20.25	0.0000	0.0000	0.0000	0.2214	0.0000	20.25	0.0000	0.1076	0.0008	0.1130	0.0000
20.40	0.0000	0.0000	0.0000	0.2124	0.0000	20.40	0.0000	0.1047	0.0005	0.1193	0.0000
20.55	0.0000	0.0000	0.0000	0.1811	0.0000	20.55	0.0000	0.0790	0.0011	0.1228	0.0000
20.70	0.0000	0.0000	0.0000	0.1463	0.0000	20.70	0.0000	0.0628	0.0011	0.1210	0.0000
20.85	0.0000	0.0000	0.0000	0.1302	0.0000	20.85	0.0000	0.0292	0.0010	0.1042	0.0000

21.00	0.0000	0.0000	0.0000	0.1326	0.0000	21.00	0.0000	0.0211	0.0012	0.0995	0.0000
21.15	0.0000	0.0000	0.0000	0.1355	0.0000	21.15	0.0000	0.0046	0.0001	0.0978	0.0000
21.30	0.0000	0.0000	0.0000	0.1291	0.0000	21.30	0.0000	0.0050	0.0006	0.0956	0.0000
21.45	0.0000	0.0000	0.0000	0.1183	0.0000	21.45	0.0000	0.0045	0.0007	0.0921	0.0000
21.60	0.0000	0.0000	0.0000	0.1173	0.0000	21.60	0.0000	0.0013	0.0000	0.0878	0.0000
21.75	0.0000	0.0000	0.0000	0.1161	0.0000	21.75	0.0000	0.0008	0.0000	0.0896	0.0000
21.90	0.0000	0.0000	0.0000	0.1155	0.0000	21.90	0.0000	0.0021	0.0000	0.0960	0.0000
22.05	0.0000	0.0000	0.0000	0.1160	0.0000	22.05	0.0000	0.0048	0.0000	0.0928	0.0000
22.20	0.0000	0.0000	0.0000	0.1176	0.0000	22.20	0.0000	0.0055	0.0000	0.0893	0.0000
22.35	0.0000	0.0000	0.0000	0.1183	0.0000	22.35	0.0000	0.0016	0.0000	0.0843	0.0000
22.50	0.0000	0.0000	0.0000	0.1180	0.0000	22.50	0.0000	0.0023	0.0000	0.0818	0.0000
22.65	0.0000	0.0000	0.0000	0.1184	0.0000	22.65	0.0000	0.0023	0.0000	0.0758	0.0000
22.80	0.0000	0.0000	0.0000	0.1534	0.0000	22.80	0.0000	0.0023	0.0000	0.0742	0.0000
22.95	0.0000	0.0000	0.0000	0.1546	0.0000	22.95	0.0000	0.0023	0.0000	0.0691	0.0000
23.10	0.0000	0.0000	0.0000	0.1554	0.0000	23.10	0.0000	0.0023	0.0000	0.0637	0.0000
23.25	0.0000	0.0000	0.0000	0.1542	0.0000	23.25	0.0000	0.0023	0.0000	0.0608	0.0000
23.40	0.0000	0.0000	0.0000	0.1531	0.0000	23.40	0.0000	0.0023	0.0000	0.0558	0.0000
23.55	0.0000	0.0000	0.0000	0.1629	0.0000	23.55	0.0000	0.0024	0.0000	0.0535	0.0000
23.70	0.0000	0.0000	0.0000	0.1746	0.0000	23.70	0.0000	0.0023	0.0000	0.0477	0.0000
23.85	0.0000	0.0000	0.0000	0.1932	0.0000	23.85	0.0000	0.0024	0.0000	0.0458	0.0000
24.00	0.0000	0.0000	0.0000	0.0601	0.0000	24.00	0.0000	0.0026	0.0000	0.0601	0.0000
24.15	0.0000	0.0000	0.0000	0.0639	0.0000	24.15	0.0000	0.0022	0.0000	0.0639	0.0000
24.30	0.0000	0.0000	0.0000	0.0618	0.0000	24.30	0.0000	0.0022	0.0000	0.0618	0.0000
24.45	0.0000	0.0000	0.0000	0.0580	0.0000	24.45	0.0000	0.0022	0.0000	0.0580	0.0000
24.60	0.0000	0.0000	0.0000	0.0559	0.0000	24.60	0.0000	0.0022	0.0000	0.0559	0.0000
24.75	0.0000	0.0000	0.0000	0.0518	0.0000	24.75	0.0000	0.0023	0.0000	0.0518	0.0000
24.90	0.0000	0.0000	0.0000	0.0517	0.0000	24.90	0.0000	0.0023	0.0000	0.0517	0.0000
25.05	0.0000	0.0000	0.0000	0.0674	0.0000	25.05	0.0000	0.0023	0.0000	0.0674	0.0000
25.20	0.0000	0.0000	0.0000	0.0730	0.0000	25.20	0.0000	0.0024	0.0000	0.0730	0.0000
25.35	0.0000	0.0000	0.0000	0.0712	0.0000	25.35	0.0000	0.0023	0.0000	0.0712	0.0000
25.50	0.0000	0.0000	0.0000	0.0608	0.0000	25.50	0.0000	0.0023	0.0000	0.0608	0.0000
25.65	0.0000	0.0000	0.0000	0.0486	0.0000	25.65	0.0000	0.0023	0.0000	0.0486	0.0000
25.80	0.0000	0.0000	0.0000	0.0538	0.0000	25.80	0.0000	0.0023	0.0000	0.0538	0.0000
25.95	0.0000	0.0000	0.0000	0.0530	0.0000	25.95	0.0000	0.0023	0.0000	0.0530	0.0000
26.10	0.0000	0.0000	0.0000	0.0808	0.0000	26.10	0.0000	0.0023	0.0000	0.0808	0.0000
26.25	0.0000	0.0000	0.0000	0.0752	0.0000	26.25	0.0000	0.0023	0.0000	0.0752	0.0000
26.40	0.0000	0.0000	0.0000	0.0714	0.0000	26.40	0.0000	0.0024	0.0000	0.0714	0.0000
26.55	0.0000	0.0000	0.0000	0.0757	0.0000	26.55	0.0000	0.0023	0.0000	0.0757	0.0000
26.70	0.0000	0.0000	0.0000	0.0766	0.0000	26.70	0.0000	0.0000	0.0000	0.0766	0.0000
26.85	0.0000	0.0000	0.0000	0.0714	0.0000	26.85	0.0000	0.0000	0.0000	0.0714	0.0000
27.00	0.0000	0.0000	0.0000	0.0687	0.0000	27.00	0.0000	0.0000	0.0000	0.0687	0.0000
27.15	0.0000	0.0000	0.0000	0.0403	0.0000	27.15	0.0000	0.0000	0.0000	0.0403	0.0000
27.30	0.0000	0.0000	0.0000	0.0404	0.0000	27.30	0.0000	0.0000	0.0000	0.0404	0.0000
27.45	0.0000	0.0000	0.0000	0.0405	0.0000	27.45	0.0000	0.0000	0.0000	0.0405	0.0000
27.60	0.0000	0.0000	0.0000	0.0410	0.0000	27.60	0.0000	0.0000	0.0000	0.0410	0.0000
27.75	0.0000	0.0000	0.0000	0.0409	0.0000	27.75	0.0000	0.0000	0.0000	0.0409	0.0000
27.90	0.0000	0.0000	0.0000	0.0408	0.0000	27.90	0.0000	0.0000	0.0000	0.0408	0.0000
28.05	0.0000	0.0000	0.0000	0.0408	0.0000	28.05	0.0000	0.0000	0.0000	0.0408	0.0000

28.20	0.0000	0.0000	0.0000	0.0406	0.0000	28.20	0.0000	0.0000	0.0000	0.0406	0.0000
28.35	0.0000	0.0000	0.0000	0.0410	0.0000	28.35	0.0000	0.0000	0.0000	0.0410	0.0000
28.50	0.0000	0.0000	0.0000	0.0408	0.0000	28.50	0.0000	0.0000	0.0000	0.0408	0.0000
28.65	0.0000	0.0000	0.0000	0.0410	0.0000	28.65	0.0000	0.0000	0.0000	0.0410	0.0000
28.80	0.0000	0.0000	0.0000	0.0408	0.0000	28.80	0.0000	0.0000	0.0000	0.0408	0.0000
28.95	0.0000	0.0000	0.0000	0.0411	0.0000	28.95	0.0000	0.0000	0.0000	0.0411	0.0000
29.10	0.0000	0.0000	0.0000	0.0398	0.0000	29.10	0.0000	0.0000	0.0000	0.0398	0.0000
29.25	0.0000	0.0000	0.0000	0.0330	0.0000	29.25	0.0000	0.0000	0.0000	0.0330	0.0000
29.40	0.0000	0.0000	0.0000	0.0333	0.0000	29.40	0.0000	0.0000	0.0000	0.0333	0.0000
29.55	0.0000	0.0000	0.0000	0.0337	0.0000	29.55	0.0000	0.0000	0.0000	0.0337	0.0000
29.70	0.0000	0.0000	0.0000	0.0331	0.0000	29.70	0.0000	0.0000	0.0000	0.0331	0.0000
29.85	0.0000	0.0000	0.0000	0.0334	0.0000	29.85	0.0000	0.0000	0.0000	0.0334	0.0000
30.00	0.0000	0.0000	0.0000	0.0341	0.0000	30.00	0.0000	0.0000	0.0000	0.0341	0.0000
30.15	0.0000	0.0000	0.0000	0.0339	0.0000	30.15	0.0000	0.0000	0.0000	0.0339	0.0000
30.30	0.0000	0.0000	0.0000	0.0343	0.0000	30.30	0.0000	0.0000	0.0000	0.0343	0.0000
30.45	0.0000	0.0000	0.0000	0.0342	0.0000	30.45	0.0000	0.0000	0.0000	0.0342	0.0000
30.60	0.0000	0.0000	0.0000	0.0343	0.0000	30.60	0.0000	0.0000	0.0000	0.0343	0.0000
30.75	0.0000	0.0000	0.0000	0.0342	0.0000	30.75	0.0000	0.0000	0.0000	0.0342	0.0000
30.90	0.0000	0.0000	0.0000	0.1444	0.0000	30.90	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
31.05	0.0000	0.0000	0.0000	0.1439	0.0000	31.05	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
31.20	0.0000	0.0000	0.0000	0.1446	0.0000	31.20	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
31.35	0.0000	0.0000	0.0000	0.1449	0.0000	31.35	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
31.50	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	31.50	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
31.65	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	31.65	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
31.80	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	31.80	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
31.95	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	31.95	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
32.10	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	32.10	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
32.25	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	32.25	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
32.40	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	32.40	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000

FRS 7 (N) - DAY 7						FRS 14 (N) - Groups x Day 0					
TIME (s)	CTLR	INJURY	PBM	AM	PBM+AM	Time(s)	CTLR	INJURY	PBM	AM	PBM+AM
0.15	0.0074	0.0000	0.0287	0.0310	0.0105	0.15	0.0177	0.0157	0.0206	0.0299	0.0296
0.30	0.0074	0.0000	0.0289	0.0310	0.0086	0.30	0.0181	0.0154	0.0205	0.0298	0.0302
0.45	0.0074	0.0000	0.0293	0.0314	0.0084	0.45	0.0181	0.0161	0.0207	0.0302	0.0292
0.60	0.0073	0.0000	0.0294	0.0312	0.0079	0.60	0.0183	0.0166	0.0206	0.0301	0.0299
0.75	0.0072	0.0000	0.0293	0.0310	0.0075	0.75	0.0182	0.0164	0.0187	0.0301	0.0368
0.90	0.0077	0.0088	0.1255	0.0374	0.0079	0.90	0.0180	0.0158	0.0208	0.1630	0.0326
1.05	0.0071	0.0105	0.0543	0.0943	0.0076	1.05	0.0181	0.0621	0.0909	0.2731	0.0443
1.20	0.0118	0.0105	0.0674	0.0458	0.0074	1.20	0.0183	0.0777	0.1300	0.1371	0.0785
1.35	0.0865	0.0104	0.1081	0.0376	0.0071	1.35	0.0181	0.0809	0.1405	0.4331	0.2361
1.50	0.2155	0.0104	0.2032	0.0851	0.0102	1.50	0.0183	0.0972	0.1264	0.6836	0.2333
1.65	0.2116	0.0104	0.3446	0.1660	0.0120	1.65	0.0184	0.0953	0.2621	0.7104	0.1114
1.80	0.2762	0.0034	0.0192	0.2285	0.0085	1.80	0.0297	0.1540	0.2667	0.8377	0.1933
1.95	0.3716	0.0095	0.0192	0.3305	0.0536	1.95	0.1674	0.2386	0.2873	0.8272	0.3680
2.10	0.4755	0.0881	0.0193	0.3847	0.1333	2.10	0.2945	0.3466	0.3740	1.0508	0.6260
2.25	0.5156	0.0786	0.0192	0.4590	0.1398	2.25	0.3672	0.3851	0.3993	1.1407	0.7938
2.40	0.5470	0.1508	0.0192	0.4963	0.1459	2.40	0.5439	0.4540	0.4933	1.2231	0.7784
2.55	0.4741	0.2311	0.0191	0.4617	0.1437	2.55	0.8130	0.5240	0.5079	1.2626	0.9125

2.70	0.5572	0.0800	0.0192	0.3368	0.2158	2.70	1.0138	0.6275	0.5591	1.1794	1.0837
2.85	0.4127	0.2789	0.0192	0.2919	0.2027	2.85	1.1086	0.7152	0.5809	1.1813	1.1206
3.00	0.3693	0.2209	0.0190	0.2593	0.2622	3.00	1.0927	0.6824	0.6284	1.0393	1.2662
3.15	0.3268	0.2922	0.0193	0.2518	0.3232	3.15	1.0675	0.6264	0.6658	0.9566	1.4160
3.30	0.3243	0.2677	0.0193	0.3172	0.4756	3.30	1.0086	0.6148	0.6747	0.8807	1.6239
3.45	0.3301	0.3907	0.0204	0.3521	0.5802	3.45	0.8710	0.5932	0.6047	0.6747	1.6047
3.60	0.3446	0.4856	0.0199	0.4263	0.7544	3.60	0.9190	0.5934	0.5465	0.5488	1.4147
3.75	0.3666	0.5586	0.0346	0.4447	0.8607	3.75	0.8895	0.6056	0.5594	0.4558	1.3846
3.90	0.3110	0.7781	0.1903	0.5552	0.8937	3.90	0.8226	0.6206	0.5545	0.3788	1.2254
4.05	0.2487	0.9923	0.2010	0.5656	0.9905	4.05	0.6289	0.6074	0.5265	0.2334	1.1201
4.20	0.2080	1.1653	0.0919	0.5732	0.9762	4.20	0.5659	0.6060	0.5271	0.2142	1.0145
4.35	0.2333	1.1862	0.1395	0.6487	0.8889	4.35	0.4846	0.5990	0.4702	0.1630	0.8644
4.50	0.2435	1.2465	0.2716	0.6381	0.9343	4.50	0.4518	0.6541	0.4241	0.1362	0.8303
4.65	0.2272	1.3151	0.4935	0.6751	0.9027	4.65	0.4125	0.6719	0.3765	0.0927	0.7237
4.80	0.1986	1.3161	0.4969	0.7433	0.9182	4.80	0.3585	0.7131	0.3366	0.0655	0.6061
4.95	0.1956	1.4151	0.7262	0.7530	0.9260	4.95	0.3201	0.7431	0.3049	0.0427	0.5109
5.10	0.2064	1.4253	0.7172	0.6579	0.9229	5.10	0.2721	0.7713	0.2676	0.0429	0.4352
5.25	0.2170	1.5760	0.8383	0.7223	0.9709	5.25	0.2608	0.8323	0.2635	0.0360	0.3738
5.40	0.2412	1.5246	0.9670	0.7778	0.9974	5.40	0.2606	0.8746	0.2364	0.0330	0.3318
5.55	0.2434	1.5359	1.0966	0.7556	1.1168	5.55	0.2145	0.9508	0.1919	0.0150	0.2741
5.70	0.2776	1.3736	1.1661	0.8090	1.0720	5.70	0.1870	0.9121	0.1188	0.0127	0.2242
5.85	0.3244	1.3142	1.1736	0.7958	1.0736	5.85	0.1742	0.8237	0.1042	0.0157	0.1959
6.00	0.3204	1.1809	0.9389	0.7978	1.0200	6.00	0.1617	0.7347	0.0933	0.0184	0.1417
6.15	0.3350	1.0970	0.8339	0.8224	0.9644	6.15	0.1415	0.6524	0.0842	0.0163	0.1125
6.30	0.3675	0.9658	0.7026	0.8160	0.8886	6.30	0.1128	0.5730	0.0811	0.0137	0.0319
6.45	0.4021	0.8617	0.7388	0.8163	0.8466	6.45	0.1086	0.4968	0.0650	0.0064	0.0211
6.60	0.4382	0.8459	0.7908	0.8280	0.8089	6.60	0.0970	0.4352	0.0571	0.0064	0.0193
6.75	0.4495	0.8399	0.8104	0.7892	0.7742	6.75	0.0947	0.3622	0.0502	0.0065	0.0107
6.90	0.4580	0.8212	0.8957	0.7077	0.7764	6.90	0.0764	0.3145	0.0393	0.0065	0.0115
7.05	0.4443	0.7757	0.9255	0.7078	0.7562	7.05	0.0608	0.2670	0.0284	0.0065	0.0102
7.20	0.4103	0.7574	1.0584	0.7116	0.7538	7.20	0.0359	0.2427	0.0227	0.0064	0.0093
7.35	0.3793	0.7719	1.0421	0.7051	0.7245	7.35	0.0268	0.1948	0.0185	0.0064	0.0023
7.50	0.3283	0.7667	1.0170	0.7131	0.7541	7.50	0.0196	0.1849	0.0182	0.0000	0.0000
7.65	0.3178	0.7935	0.9477	0.7036	0.7489	7.65	0.0038	0.1707	0.0178	0.0000	0.0000
7.80	0.3107	0.7174	0.8455	0.9106	0.7535	7.80	0.0039	0.0956	0.0159	0.0000	0.0000
7.95	0.3306	0.7393	0.8050	0.9190	0.7413	7.95	0.0035	0.0600	0.0089	0.0000	0.0000
8.10	0.3544	0.6784	0.7639	0.9636	0.6896	8.10	0.0035	0.0413	0.0095	0.0000	0.0000
8.25	0.3979	0.7894	0.7853	0.9633	0.6876	8.25	0.0034	0.0247	0.0053	0.0000	0.0000
8.40	0.4206	0.8032	0.7229	0.9031	0.6784	8.40	0.0035	0.0181	0.0053	0.0000	0.0000
8.55	0.4197	0.8115	0.6623	0.8226	0.7084	8.55	0.0034	0.0181	0.0054	0.0000	0.0000
8.70	0.3912	0.7680	0.5867	0.7423	0.6946	8.70	0.0034	0.0214	0.0047	0.0000	0.0000
8.85	0.2921	0.7394	0.5418	0.6924	0.7495	8.85	0.0034	0.0201	0.0047	0.0000	0.0000
9.00	0.2618	0.6597	0.4634	0.6968	0.8707	9.00	0.0000	0.0203	0.0000	0.0000	0.0000
9.15	0.2555	0.5994	0.4439	0.7014	0.8501	9.15	0.0000	0.0207	0.0000	0.0000	0.0000
9.30	0.2054	0.4502	0.4422	0.7234	0.8430	9.30	0.0000	0.0163	0.0000	0.0000	0.0000
9.45	0.1872	0.3377	0.4352	0.6485	0.7755	9.45	0.0000	0.0079	0.0000	0.0000	0.0000
9.60	0.1579	0.3032	0.4449	0.6392	0.7395	9.60	0.0000	0.0082	0.0000	0.0000	0.0000
9.75	0.1446	0.2526	0.4261	0.6853	0.7308	9.75	0.0000	0.0056	0.0000	0.0000	0.0000

9.90	0.1343	0.2253	0.4268	0.6584	0.7225	9.90	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
10.05	0.1311	0.1736	0.4196	0.6597	0.7428	10.05	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
10.20	0.1325	0.1543	0.4259	0.6848	0.7260	10.20	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
10.35	0.1318	0.1218	0.4455	0.6835	0.7064	10.35	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
10.50	0.1332	0.1067	0.3741	0.6896	0.6986	10.50	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
10.65	0.1339	0.0959	0.3658	0.6642	0.7130	10.65	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
10.80	0.1331	0.0908	0.3962	0.5874	0.7036	10.80	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
10.95	0.1337	0.0955	0.3789	0.4952	0.6888	10.95	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
11.10	0.1364	0.1123	0.3570	0.5928	0.6841	11.10	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
11.25	0.1366	0.1211	0.3352	0.6280	0.6771	11.25	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
11.40	0.1387	0.1325	0.3264	0.8676	0.6664	11.40	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
11.55	0.1379	0.1351	0.3084	0.8154	0.6503	11.55	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
11.70	0.1380	0.1289	0.2998	0.7820	0.6396	11.70	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
11.85	0.1386	0.1385	0.2866	0.7267	0.6393	11.85	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
12.00	0.1372	0.1417	0.2741	0.6996	0.6355	12.00	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
12.15	0.1359	0.2081	0.2714	0.6711	0.6324	12.15	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
12.30	0.1274	0.2046	0.2669	0.6016	0.6139	12.30	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
12.45	0.1224	0.2313	0.2611	0.5916	0.6119	12.45	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
12.60	0.1124	0.2274	0.2475	0.6031	0.6093	12.60	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
12.75	0.0966	0.2167	0.2453	0.6275	0.5819	12.75	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
12.90	0.0874	0.1910	0.2394	0.6201	0.5700	12.90	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
13.05	0.0668	0.2101	0.2317	0.5954	0.5507	13.05	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
13.20	0.0660	0.2075	0.2256	0.5633	0.5417	13.20	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
13.35	0.0607	0.2021	0.2096	0.5752	0.5537	13.35	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
13.50	0.0405	0.2365	0.1998	0.5667	0.5491	13.50	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
13.65	0.0377	0.2180	0.1837	0.5988	0.5421	13.65	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
13.80	0.0348	0.1965	0.1540	0.6271	0.5367	13.80	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
13.95	0.0193	0.1903	0.1380	0.6173	0.5334	13.95	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
14.10	0.0079	0.1864	0.1630	0.6171	0.5193	14.10	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
14.25	0.0077	0.1874	0.1549	0.6146	0.5043	14.25	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
14.40	0.0082	0.1975	0.1756	0.6141	0.4421	14.40	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
14.55	0.0037	0.2046	0.1879	0.6076	0.4276	14.55	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
14.70	0.0038	0.2010	0.1847	0.5784	0.3753	14.70	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
14.85	0.0042	0.1926	0.1861	0.5652	0.3356	14.85	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
15.00	0.0033	0.1940	0.2028	0.5863	0.3315	15.00	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
15.15	0.0042	0.1945	0.1693	0.5834	0.3050	15.15	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
15.30	0.0057	0.1959	0.1585	0.5785	0.2995	15.30	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
15.45	0.0058	0.1961	0.1592	0.5746	0.2903	15.45	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
15.60	0.0065	0.1957	0.1491	0.5445	0.2899	15.60	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
15.75	0.0065	0.1919	0.1453	0.5296	0.2886	15.75	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
15.90	0.0058	0.1865	0.1616	0.5063	0.2882	15.90	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
16.05	0.0060	0.1824	0.1486	0.4592	0.2850	16.05	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
16.20	0.0072	0.1625	0.1805	0.4364	0.2845	16.20	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
16.35	0.0000	0.1559	0.1720	0.2510	0.2857	16.35	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
16.50	0.0000	0.1603	0.1462	0.1648	0.2785	16.50	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
16.65	0.0000	0.1384	0.1517	0.1529	0.2745	16.65	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
16.80	0.0000	0.1269	0.1357	0.1319	0.2729	16.80	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
16.95	0.0000	0.1133	0.1382	0.1108	0.2619	16.95	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000

17.10	0.0000	0.1100	0.1340	0.1125	0.2478	17.10	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
17.25	0.0000	0.1053	0.0952	0.1014	0.2304	17.25	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
17.40	0.0000	0.1023	0.0792	0.0731	0.2156	17.40	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
17.55	0.0000	0.1015	0.0439	0.0724	0.1742	17.55	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
17.70	0.0000	0.1007	0.0202	0.0611	0.1668	17.70	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
17.85	0.0000	0.1013	0.0001	0.0599	0.1668	17.85	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
18.00	0.0000	0.1023	0.0056	0.0577	0.1449	18.00	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
18.15	0.0000	0.1013	0.0056	0.0555	0.1331	18.15	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
18.30	0.0000	0.0935	0.0057	0.0477	0.1111	18.30	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
18.45	0.0000	0.0941	0.0056	0.0536	0.0941	18.45	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
18.60	0.0000	0.0935	0.0057	0.0566	0.0738	18.60	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
18.75	0.0000	0.0861	0.0057	0.0928	0.0738	18.75	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
18.90	0.0000	0.0849	0.0057	0.0983	0.0714	18.90	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
19.05	0.0000	0.0823	0.0057	0.1031	0.0676	19.05	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
19.20	0.0000	0.0822	0.0056	0.1057	0.0681	19.20	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
19.35	0.0000	0.0807	0.0057	0.1025	0.0670	19.35	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
19.50	0.0000	0.0805	0.0057	0.0382	0.0659	19.50	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
19.65	0.0000	0.0831	0.0060	0.0402	0.0620	19.65	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
19.80	0.0000	0.0732	0.0058	0.0511	0.0561	19.80	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
19.95	0.0000	0.0770	0.0007	0.0278	0.0552	19.95	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
20.10	0.0000	0.0696	0.0056	0.0272	0.0543						
20.25	0.0000	0.0646	0.0056	0.0288	0.0305						
20.40	0.0000	0.0507	0.0057	0.0308	0.0153						
20.55	0.0000	0.0434	0.0056	0.0313	0.0138						
20.70	0.0000	0.0376	0.0057	0.0327	0.0082						
20.85	0.0000	0.0351	0.0057	0.0330	0.0057						
21.00	0.0000	0.0337	0.0057	0.0000	0.0047						
21.15	0.0000	0.0334	0.0057	0.0000	0.0056						
21.30	0.0000	0.0353	0.0056	0.0000	0.0056						
21.45	0.0000	0.0380	0.0057	0.0000	0.0054						
21.60	0.0000	0.0398	0.0057	0.0000	0.0099						
21.75	0.0000	0.0410	0.0060	0.0000	0.0113						
21.90	0.0000	0.0381	0.0000	0.0000	0.0136						
22.05	0.0000	0.0348	0.0000	0.0000	0.0138						
22.20	0.0000	0.0263	0.0000	0.0000	0.0120						
22.35	0.0000	0.0226	0.0000	0.0000	0.0134						
22.50	0.0000	0.0160	0.0000	0.0000	0.0170						
22.65	0.0000	0.0128	0.0000	0.0000	0.0187						
22.80	0.0000	0.0097	0.0000	0.0000	0.0213						
22.95	0.0000	0.0143	0.0000	0.0000	0.0217						
23.10	0.0000	0.0120	0.0000	0.0000	0.0260						
23.25	0.0000	0.0084	0.0000	0.0000	0.0102						
23.40	0.0000	0.0061	0.0000	0.0000	0.0101						
23.55	0.0000	0.0012	0.0000	0.0000	0.0122						
23.70	0.0000	0.0005	0.0000	0.0000	0.0160						
23.85	0.0000	0.0043	0.0000	0.0000	0.0061						
24.00	0.0000	0.0050	0.0000	0.0000	0.0049						
24.15	0.0000	0.0047	0.0000	0.0000	0.0034						

24.30	0.0000	0.0014	0.0000	0.0000	0.0029
24.45	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0006
24.60	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0013
24.75	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0016
24.90	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0019
25.05	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0020
25.20	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0021
25.35	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0022
25.50	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0024
25.65	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0020
25.80	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0017
25.95	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0019
26.10	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0023
26.25	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0019
26.40	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0017
26.55	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0018
26.70	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0021
26.85	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0022
27.00	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0023
27.15	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0026
27.30	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0025
27.45	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0026
27.60	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0026
27.75	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0027
27.90	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0026
28.05	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0024
28.20	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0027
28.35	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0027
28.50	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0029
28.65	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0027
28.80	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
28.95	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
29.10	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
29.25	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
29.40	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
29.55	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
29.70	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
29.85	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
30.00	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
30.15	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
30.30	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
30.45	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
30.60	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
30.75	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
30.90	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
31.05	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
31.20	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
31.35	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000

31.50	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
31.65	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
31.80	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
31.95	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
32.10	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
32.25	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
32.40	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000

FRS 14 (N) - Groups x Day 7						FRS 14 (N) - Groups x Day 14					
Time(s)	CTLR	INJURY	PBM	AM	PBM+AM	Time(s)	CTLR	INJURY	PBM	AM	PBM+AM
0.15	0.0074	0.0160	0.0068	0.0186	0.0171	0.15	0.0060	0.0064	0.0065	0.0150	0.0198
0.30	0.0074	0.0157	0.0081	0.0173	0.0168	0.30	0.0071	0.0064	0.0064	0.0144	0.0196
0.45	0.0074	0.0116	0.0088	0.0188	0.0173	0.45	0.0120	0.0065	0.0063	0.0163	0.0202
0.60	0.0073	0.0114	0.0080	0.0178	0.0615	0.60	0.0203	0.0063	0.0062	0.0423	0.0257
0.75	0.0076	0.0115	0.0079	0.0182	0.1533	0.75	0.0601	0.0063	0.0052	0.1508	0.0710
0.90	0.0084	0.0114	0.0086	0.0192	0.2421	0.90	0.0509	0.0063	0.0341	0.1282	0.1033
1.05	0.0076	0.0121	0.0235	0.0304	0.3406	1.05	0.0377	0.0104	0.1003	0.3226	0.1164
1.20	0.0117	0.0303	0.0657	0.3848	0.4865	1.20	0.1222	0.0464	0.2171	0.3856	0.1224
1.35	0.0878	0.0347	0.0921	0.2063	0.5088	1.35	0.2777	0.0459	0.2375	0.5597	0.2036
1.50	0.2243	0.0517	0.0895	0.3819	0.6656	1.50	0.4528	0.1291	0.2747	0.6001	0.3733
1.65	0.2342	0.0839	0.1308	0.6139	0.8200	1.65	0.4826	0.1255	0.3550	0.4677	0.5408
1.80	0.2941	0.1713	0.2401	0.6769	0.9985	1.80	0.4319	0.1214	0.4177	0.5361	0.7001
1.95	0.4340	0.1772	0.3153	1.0204	1.1203	1.95	0.4817	0.1350	0.5289	0.6176	0.8520
2.10	0.5987	0.2044	0.3888	1.1831	1.2009	2.10	0.6718	0.1781	0.6096	0.6653	1.1111
2.25	0.7189	0.2589	0.4453	1.1856	1.2319	2.25	0.9202	0.2366	0.7224	0.8052	1.4084
2.40	0.8733	0.3535	0.5104	1.1151	1.3636	2.40	1.1188	0.2911	0.8002	0.9233	1.8358
2.55	0.8090	0.3711	0.6097	1.2248	1.4024	2.55	1.1487	0.3441	0.8295	1.1566	2.0038
2.70	0.8791	0.4909	0.6932	1.3290	1.4002	2.70	1.0927	0.3646	0.8058	1.2864	2.1364
2.85	0.7609	0.5614	0.5477	1.4169	1.4406	2.85	0.8395	0.4411	0.8621	1.5646	1.7757
3.00	0.7825	0.5069	0.6095	1.3022	1.4830	3.00	0.6899	0.4779	0.7735	1.6595	1.3770
3.15	0.7781	0.3902	0.5873	1.2885	1.5475	3.15	0.3851	0.4995	0.6823	1.7126	1.0264
3.30	0.7794	0.4548	0.7213	1.1698	1.5178	3.30	0.2843	0.5420	0.7170	1.5369	0.7480
3.45	0.7647	0.4560	0.7716	1.0007	1.2581	3.45	0.2290	0.5686	0.7516	1.1930	0.6149
3.60	0.6833	0.4785	0.7513	0.9177	1.1631	3.60	0.1951	0.6374	0.8371	1.0963	0.4496
3.75	0.5528	0.5000	0.7779	0.7611	1.1107	3.75	0.1850	0.7051	0.8847	1.0107	0.2405
3.90	0.5723	0.5691	0.8517	0.6861	1.0778	3.90	0.1566	0.7851	0.9682	0.8970	0.1192
4.05	0.6046	0.6179	1.0125	0.6171	1.0424	4.05	0.1350	0.8422	0.9433	0.8473	0.0393
4.20	0.6291	0.7016	0.9637	0.5648	1.0967	4.20	0.0964	0.8795	0.8100	0.7373	0.0326
4.35	0.6802	0.7496	0.7224	0.4783	1.0528	4.35	0.0883	1.0026	0.7460	0.6645	0.0278
4.50	0.6603	0.8418	0.6400	0.3710	0.9839	4.50	0.0912	1.0497	0.7695	0.6225	0.0285
4.65	0.5921	0.9448	0.6348	0.1926	0.8258	4.65	0.0786	0.9421	0.7370	0.6018	0.0304
4.80	0.4571	0.9454	0.6089	0.1658	0.6712	4.80	0.0666	0.8162	0.7345	0.5672	0.0260
4.95	0.3986	0.8615	0.5660	0.1142	0.5286	4.95	0.0422	0.7875	0.7386	0.5198	0.0204
5.10	0.3494	0.6397	0.4563	0.0969	0.3008	5.10	0.0373	0.8289	0.7351	0.5199	0.0190
5.25	0.2828	0.5149	0.3615	0.0832	0.2467	5.25	0.0357	0.9260	0.7204	0.4842	0.0051
5.40	0.2538	0.5021	0.2477	0.0555	0.2024	5.40	0.0352	0.9947	0.6633	0.3752	0.0049
5.55	0.2304	0.4670	0.2181	0.0371	0.1678	5.55	0.0119	0.9539	0.5211	0.3406	0.0071
5.70	0.1942	0.4427	0.1807	0.0263	0.1522	5.70	0.0058	0.8119	0.4352	0.2902	0.0091
5.85	0.1748	0.4346	0.1611	0.0228	0.1042	5.85	0.0025	0.7239	0.4029	0.1997	0.0000

6.00	0.1568	0.4275	0.1706	0.0091	0.0753	6.00	0.0021	0.6820	0.3598	0.1552	0.0000
6.15	0.1637	0.4212	0.1183	0.0138	0.0546	6.15	0.0023	0.6621	0.3090	0.1296	0.0000
6.30	0.1698	0.4147	0.0972	0.0167	0.0303	6.30	0.0000	0.6100	0.2776	0.0848	0.0000
6.45	0.1275	0.5446	0.0795	0.0171	0.0095	6.45	0.0000	0.5668	0.2571	0.0384	0.0000
6.60	0.1174	0.5370	0.0582	0.0161	0.0096	6.60	0.0000	0.5431	0.2558	0.0126	0.0000
6.75	0.1174	0.5364	0.0438	0.0108	0.0152	6.75	0.0000	0.4740	0.2522	0.0122	0.0000
6.90	0.1055	0.5311	0.0274	0.0108	0.0117	6.90	0.0000	0.4610	0.2450	0.0175	0.0000
7.05	0.1006	0.5242	0.0258	0.0100	0.0090	7.05	0.0000	0.4728	0.2145	0.0131	0.0000
7.20	0.0885	0.4972	0.0257	0.0089	0.0034	7.20	0.0000	0.4811	0.1998	0.0158	0.0000
7.35	0.0818	0.3529	0.0235	0.0115	0.0000	7.35	0.0000	0.4747	0.1808	0.0189	0.0000
7.50	0.0732	0.3575	0.0221	0.0099	0.0000	7.50	0.0000	0.4710	0.1781	0.0214	0.0000
7.65	0.0703	0.3550	0.0195	0.0093	0.0000	7.65	0.0000	0.4645	0.1604	0.0134	0.0000
7.80	0.0381	0.3518	0.0133	0.0094	0.0000	7.80	0.0000	0.4679	0.1294	0.0227	0.0000
7.95	0.0318	0.3566	0.0144	0.0084	0.0000	7.95	0.0000	0.4699	0.0955	0.0222	0.0000
8.10	0.0098	0.3468	0.0163	0.0071	0.0000	8.10	0.0000	0.4855	0.0889	0.0021	0.0000
8.25	0.0112	0.3814	0.0158	0.0075	0.0000	8.25	0.0000	0.4963	0.0892	0.0020	0.0000
8.40	0.0095	0.3964	0.0095	0.0079	0.0000	8.40	0.0000	0.5082	0.0425	0.0019	0.0000
8.55	0.0112	0.4030	0.0040	0.0082	0.0000	8.55	0.0000	0.5419	0.0401	0.0019	0.0000
8.70	0.0088	0.3901	0.0013	0.0000	0.0000	8.70	0.0000	0.5648	0.0380	0.0019	0.0000
8.85	0.0064	0.3850	0.0016	0.0000	0.0000	8.85	0.0000	0.6074	0.0370	0.0000	0.0000
9.00	0.0059	0.3678	0.0016	0.0000	0.0000	9.00	0.0000	0.6403	0.0273	0.0000	0.0000
9.15	0.0059	0.3640	0.0017	0.0000	0.0000	9.15	0.0000	0.6401	0.0218	0.0000	0.0000
9.30	0.0059	0.3556	0.0017	0.0000	0.0000	9.30	0.0000	0.5489	0.0013	0.0000	0.0000
9.45	0.0060	0.3671	0.0016	0.0000	0.0000	9.45	0.0000	0.4536	0.0013	0.0000	0.0000
9.60	0.0000	0.3940	0.0017	0.0000	0.0000	9.60	0.0000	0.4384	0.0012	0.0000	0.0000
9.75	0.0000	0.4115	0.0000	0.0000	0.0000	9.75	0.0000	0.3869	0.0013	0.0000	0.0000
9.90	0.0000	0.4045	0.0000	0.0000	0.0000	9.90	0.0000	0.3556	0.0012	0.0000	0.0000
10.05	0.0000	0.3791	0.0000	0.0000	0.0000	10.05	0.0000	0.2823	0.0013	0.0000	0.0000
10.20	0.0000	0.3597	0.0000	0.0000	0.0000	10.20	0.0000	0.2111	0.0000	0.0000	0.0000
10.35	0.0000	0.4362	0.0000	0.0000	0.0000	10.35	0.0000	0.1830	0.0000	0.0000	0.0000
10.50	0.0000	0.4203	0.0000	0.0000	0.0000	10.50	0.0000	0.1655	0.0000	0.0000	0.0000
10.65	0.0000	0.4251	0.0000	0.0000	0.0000	10.65	0.0000	0.1605	0.0000	0.0000	0.0000
10.80	0.0000	0.4102	0.0000	0.0000	0.0000	10.80	0.0000	0.1476	0.0000	0.0000	0.0000
10.95	0.0000	0.4049	0.0000	0.0000	0.0000	10.95	0.0000	0.1388	0.0000	0.0000	0.0000
11.10	0.0000	0.3900	0.0000	0.0000	0.0000	11.10	0.0000	0.1161	0.0000	0.0000	0.0000
11.25	0.0000	0.3672	0.0000	0.0000	0.0000	11.25	0.0000	0.1110	0.0000	0.0000	0.0000
11.40	0.0000	0.3622	0.0000	0.0000	0.0000	11.40	0.0000	0.1163	0.0000	0.0000	0.0000
11.55	0.0000	0.3261	0.0000	0.0000	0.0000	11.55	0.0000	0.1027	0.0000	0.0000	0.0000
11.70	0.0000	0.3009	0.0000	0.0000	0.0000	11.70	0.0000	0.0875	0.0000	0.0000	0.0000
11.85	0.0000	0.2544	0.0000	0.0000	0.0000	11.85	0.0000	0.0840	0.0000	0.0000	0.0000
12.00	0.0000	0.2385	0.0000	0.0000	0.0000	12.00	0.0000	0.0828	0.0000	0.0000	0.0000
12.15	0.0000	0.2189	0.0000	0.0000	0.0000	12.15	0.0000	0.0833	0.0000	0.0000	0.0000
12.30	0.0000	0.2107	0.0000	0.0000	0.0000	12.30	0.0000	0.0824	0.0000	0.0000	0.0000
12.45	0.0000	0.2009	0.0000	0.0000	0.0000	12.45	0.0000	0.0822	0.0000	0.0000	0.0000
12.60	0.0000	0.1924	0.0000	0.0000	0.0000	12.60	0.0000	0.0827	0.0000	0.0000	0.0000
12.75	0.0000	0.2087	0.0000	0.0000	0.0000	12.75	0.0000	0.0829	0.0000	0.0000	0.0000
12.90	0.0000	0.1987	0.0000	0.0000	0.0000	12.90	0.0000	0.0680	0.0000	0.0000	0.0000
13.05	0.0000	0.1651	0.0000	0.0000	0.0000	13.05	0.0000	0.0586	0.0000	0.0000	0.0000

