

Estudio preclínico de quemaduras experimentales tratadas con fotobiomodulación y membrana amniótica humana, solas y combinadas*

Fernanda Cláudia Miranda Amorim^{1,2}

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

Emilia Ângela Loschiavo Arisawa²

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

Luciana Barros Sant'anna²

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

Ana Beatriz Mendes Rodrigues^{3,4}

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

Davidson Ribeiro Costa²

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

Destacados: (1) Asociación de tecnología con biomateriales. (2) Innovación en Ingeniería de Tejidos. (3) Protocolo para el tratamiento de quemaduras.

Objetivo: evaluar el efecto de la fotobiomodulación con láser de baja intensidad 660 nm de sola o combinada con la membrana amniótica humana en la reparación de quemaduras de espesor parcial en ratas.

Método: estudio experimental con 48 ratas Wistar macho, aleatorizadas en cuatro grupos: Control, Membrana Amniótica Humana, Terapia con Láser de Baja Intensidad y Terapia con Láser de Baja Intensidad combinada con la Membrana Amniótica Humana. Las características histopatológicas de las muestras de piel fueron analizadas a los 7 y 14 días después de la quemadura. Los datos obtenidos fueron sometidos a las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Mann-Whitney.

Resultados: el análisis histológico de las lesiones por quemadura mostró una disminución de la inflamación ($p < 0,0001$) y un aumento de la proliferación de fibroblastos ($p < 0,0001$) principalmente a los 7 días en todos los tratamientos en comparación con el grupo control; a los 14 días, en el grupo de Terapia con Láser de Baja Intensidad combinada con la Membrana Amniótica Humana la mayor efectividad en la aceleración del proceso de cicatrización fue significativa ($p < 0,0001$). **Conclusión:** la asociación de terapias de fotobiomodulación con la membrana amniótica humana permitió comprobar que hubo una reducción en el tiempo del proceso de cicatrización de lesiones experimentales, lo cual favorece que se proponga como protocolo de tratamiento en quemaduras de espesor parcial.

Descriptorios: Quemaduras; Amnios; Terapia con Luz de Baja Intensidad; Cicatrización; Piel; Ratas.

* Artículo parte de la tesis de doctorado "Terapia a Laser de baixa intensidade e membrana amniótica humana aplicadas em modelo experimental de queimadura", presentada en la Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, SP, Brasil.

¹ Centro Universitário UNINOVAFAPI, Teresina, PI, Brasil.

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

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

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

Como citar este artículo

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

Introducción

Las quemaduras en la piel son lesiones causadas por el calor, la radiación, la radioactividad, la electricidad, la fricción o el contacto con productos químicos. En el mundo, cerca de 180.000 personas mueren cada año como consecuencia de esta enfermedad, esto también afecta a países como Brasil que en la última década ha tenido altas tasas de mortalidad hospitalaria por quemaduras⁽¹⁻²⁾.

Las quemaduras térmicas ocurren por escaldaduras (líquidos calientes), quemaduras por contacto (sólidos calientes) o quemaduras por llama⁽¹⁾. Este tipo de lesiones, además de ser las más prevalentes y extenuantes, perjudican directamente las fases del correcto proceso de cicatrización, dado que sus principales características son angiogénesis reducida, inflamación sostenida, estrés oxidativo, aumento de la proteólisis y septicemia⁽³⁾.

En cuanto a la profundidad, las quemaduras se pueden clasificar en: espesor superficial (primer grado), parcial superficial (segundo grado), profunda superficial (segundo grado) y espesor total (tercer o cuarto grado). Histológicamente, las quemaduras de espesor superficial afectan solo a la epidermis; las de espesores parciales superficiales alcanzan la epidermis y la dermis papilar, pero los anexos cutáneos permanecen intactos; las de espesor profunda superficial dañan la epidermis y la dermis reticular y destruyen la mayor parte de los apéndices cutáneos; en las de espesor total, se destruye toda la epidermis, la dermis y los apéndices cutáneos (tercer grado), y puede incluso comprometer la fascia muscular y/o el hueso (cuarto grado)⁽⁴⁾.

Las principales características clínicas de las lesiones de espesor parcial superficiales son eritema, ampollas, humedad, hiperemia, palidez por presión y tiempo de cicatrización de 7 a 20 días⁽⁴⁾. Por lo tanto, el proceso de cicatrización de las lesiones por quemadura es complejo, ya que involucra células diferenciadas que se activan durante fases distintas y superpuestas del proceso de reparación tisular denominadas inflamación, proliferación y remodelación⁽⁵⁾.

Las lesiones resultantes de las quemaduras presentan desafíos en el proceso de reparación de la piel, dado que el área quemada tiene características que dificultan la reparación, como bordes irregulares y necrosis tisular, además pueden llegar a la epidermis, la dermis y los tejidos profundos. Cabe destacar que requieren internación y generan altos costos hospitalarios⁽⁶⁾.

El ambiente multifacético de la cicatrización de heridas causadas por quemaduras estimuló la investigación sobre intervenciones terapéuticas innovadoras que permitan la reparación inmediata de la lesión⁽⁷⁾. Por ende, es fundamental definir una estrategia que se adecue a las

necesidades y la complejidad de las quemaduras para que los tratamientos terapéuticos sean exitosos en términos de rendimiento y coste. Los biomateriales y las nuevas tecnologías se destacan por tener propiedades generales capaces de inducir diferentes respuestas biológicas que se pueden adaptar según la aplicación⁽⁸⁾.

En cuanto a las tecnologías, la fotobiomodulación con el uso de Terapia Láser de Baja Intensidad (TLBI) se destaca porque ayuda a la cicatrización de las heridas debido a que tiene efectos biomoduladores⁽⁹⁻¹¹⁾. Por otro lado, en lo que respecta a los biomateriales, la Membrana Amniótica humana (MAh) se ha utilizado como una alternativa promisoriosa, tiene gran potencial de aplicación en la medicina regenerativa por presentar baja antigenicidad, protección contra infecciones y por actuar como sustrato para la epitelización⁽¹²⁾. Por ende, varios estudios han evaluado clínicamente el beneficio de la MAh como sustituto biológico⁽¹³⁻¹⁵⁾.

Por lo tanto, considerando la complejidad de la terapia de quemaduras y la necesidad de estudios experimentales que investiguen tratamientos alternativos que favorezcan la regeneración de tejidos con esta condición, el presente estudio evaluó el efecto de la TLBI combinada con la MAh en la reparación de quemaduras de espesor parcial superficiales en ratas.

Método

Tipo de estudio

Esta es una investigación experimental con enfoque cuantitativo.

Lugar del estudio

La investigación se llevó a cabo en el laboratorio de cirugía experimental del Centro Universitario UNINOVAFAPI, ubicado en la ciudad de Teresina (PI), Brasil.

Periodo de estudio

La recolección de datos se llevó a cabo de enero a marzo de 2019.

Animales

Se estudiaron 48 ratas macho (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), de 40 días de edad, peso 200 ± 50 g, que fueron mantenidas en jaulas de polipropileno en condiciones asépticas, se les proporcionó alimentación específica con ración y agua *ad libitum*, fueron expuestas a un ciclo de luz y oscuridad de 12/12 horas, alojados en jaulas individuales.

Grupos de estudio

Los animales fueron aleatorizados y distribuidos en cuatro grupos, con doce animales cada uno: Control (C), animales sometidos a quemaduras experimentales sin tratamiento; Membrana Amniótica Humana (MAh), ratas sometidas a quemaduras experimentales tratadas con la aplicación de fragmento de MAh; Terapia Láser de Baja Intensidad (TLBI), animales sometidos a quemaduras experimentales tratados con TLBI; y TLBI+MAh, animales sometidos a quemaduras experimentales tratados con la asociación de TLBI y MAh. Los animales de los 4 (cuatro) grupos fueron subdivididos en 2 (dos) subgrupos en función del tiempo que duró el experimento, 7 y 14 días, cada grupo tenía 6 animales.

Recolección de datos

El protocolo experimental se desarrolló en cinco etapas: obtención de la placenta humana, procesamiento del biomaterial, inducción de la quemadura, aplicación de los fragmentos de MAh y de la TLBI, solas o combinadas.

Las placentas fueron recolectadas de dos parturientas seleccionadas, después de que firmaran el Término de Consentimiento Libre e Informado (TCLI), sometidas a cesárea electiva, sin historial de enfermedades, con resultados negativos en las pruebas serológicas de VIH-1, VDRL, HBsAg y anti-VHC, edad gestacional de 37 semanas a 41 semanas y 6 días (placenta a término), según los criterios establecidos en un estudio previo⁽¹⁶⁾.

La placenta se inspeccionó inmediatamente después de su extracción, se colocó en una bolsa de plástico estéril y a una temperatura de 10°C y se transportó al laboratorio de cirugía experimental. El biomaterial fue procesado en un ambiente aséptico, siguiendo los protocolos descritos⁽¹⁶⁾, se aisló la MAh, se la seccionó en fragmentos de dimensiones adecuadas para la presente investigación (4 x 4 cm), y fueron utilizadas dentro de las 24 horas⁽¹⁷⁾.

Inicialmente, los animales fueron pesados, sedados (Xilazina 2%, 0,01 ml/kg y Ketamina 10%, 0,005 ml/kg) y rasurados de la región dorsal. La quemadura experimental fue inducida utilizando una probeta (3 cm de diámetro), llena con 50 ml de agua calentada a 100°C, apoyada directamente sobre la piel de la región depilada durante 10 segundos, sin presión adicional. Posteriormente, las lesiones fueron evaluadas considerando los aspectos macroscópicos, que incluyeron la observación del color (rojo o rosa) y la presencia de una ampolla para caracterizar la quemadura de espesor parcial superficial⁽⁴⁾.

Los animales del grupo C no recibieron tratamiento. A los animales de los grupos MAh y TLBI+MAh, inmediatamente después de la quemadura, se les aplicaron fragmentos de MAh, la superficie mesenquimatosa se colocó en contacto con el área de

la lesión cutánea, sus bordes sobresalían 1 cm, y se fijaron con un adhesivo tópico.

El protocolo utilizado en los animales del grupo TLBI incluyó la aplicación de láser. Las primeras aplicaciones de láser se realizaron 30 minutos después de la inducción de la quemadura y se repitieron a intervalos de 24 horas. Se utilizó el dispositivo Laserpulse Ibramed® (Industria Brasileña de Equipamientos Médicos - IBRAMED), y los parámetros de irradiación utilizados en el experimento fueron: longitud de onda de 660 nm, potencia de 30 mW, tiempo de irradiación de 12 segundos por punto, área de contacto de 0,06310 cm², densidad de energía de 6 J/cm², parámetros de pulso continuo, tratamiento de única dosis con intervalos de 24 horas, la localización anatómica fue el dorso del animal.

Las irradiaciones se realizaron puntualmente en cuatro puntos equidistantes, en forma de cruz, a 1 cm entre el borde de la lesión y el punto de irradiación, con un ángulo de 90° y la punta del láser estaba protegida por una película transparente estéril, para evitar una posible contaminación.

En el grupo MAh + TLBI se combinaron los protocolos descritos para los grupos MAh y TLBI, y se aplicó el láser sobre la membrana amniótica, cada 24 horas, en los dos tiempos del experimento estudiados (7 y 14 días).

Los animales fueron sacrificados cuando terminó el experimento según los tiempos estudiados (a los 7 o 14 días) mediante la administración de una sobredosis de anestésico (tiopental sódico 100 mg/kg, por vía intraperitoneal). El área quemada y el tejido circundante se retiraron con cuidado y se fijaron en formalina tamponada neutra (10%).

Técnicas histológicas

El área de la piel quemada y el área circundante, que incluyó toda el área de la lesión y los bordes del tejido normal adyacente (1 cm del borde), se retiraron y fijaron en formalina tamponada al 4% durante 48 horas y luego se transfirieron a una solución de alcohol al 70%, posteriormente fueron diafanizadas con xileno e incluidas en parafina. Se realizaron cuatro secciones histológicas longitudinales de 2 a 3 µm de cada bloque, se extendieron sobre portaobjetos de vidrio y se tiñeron con Hematoxilina y Eosina (H&E) y Picossirius Red.

Evaluaciones histológicas y morfométricas

El área lesionada se evaluó macroscópicamente después de la quemadura y durante todo el experimento, se consideró el color de la piel, la presencia de flictenas y la formación de costras superficiales. Las secciones histológicas teñidas con H&E se digitalizaron utilizando el microscopio Leica® DM 2500 conectado a la cámara Leica® DFC 425 y el

programa Leica® Application Suite LAS v3.7. Las imágenes se obtuvieron de las secciones transversales de cuatro campos secuenciales de cada portaobjetos, con objetivos de 10X y 40X, bajo un microscopio óptico. Para cuantificar el número de células inflamatorias (neutrófilos y macrófagos) y de fibroblastos (jóvenes y adultos), se analizaron las imágenes con el *software ImageJ*, lo que permitió crear una cuadrícula y etiquetar individualmente los núcleos celulares con ayuda de herramienta de conteo manual.

Los portaobjetos teñidos con Picrosirius Red se evaluaron mediante análisis de imagen digital para calcular el área ocupada por el depósito de colágeno tipo I y III, y se fotografiaron con un objetivo de 10X, con un microscopio con luz polarizada (Leica® DM 2000) conectado a la cámara (Leica® DFC 425). Para cuantificar el porcentaje de colágeno tipo I y III se utilizó el programa Image-Pro Plus 4.5. Para analizar la presencia de colágeno con luz polarizada e identificar los tipos de colágeno se consideró las siguientes especificaciones: colágeno tipo I - color amarillo-rojizo; y colágeno tipo III - color verde blanquecino. Todos los análisis histomorfométricos se realizaron a ciegas.

Análisis estadístico

Para determinar la prueba estadística se evaluó el coeficiente de variación y la distribución de la muestra de los datos recolectados. Se utilizó el programa

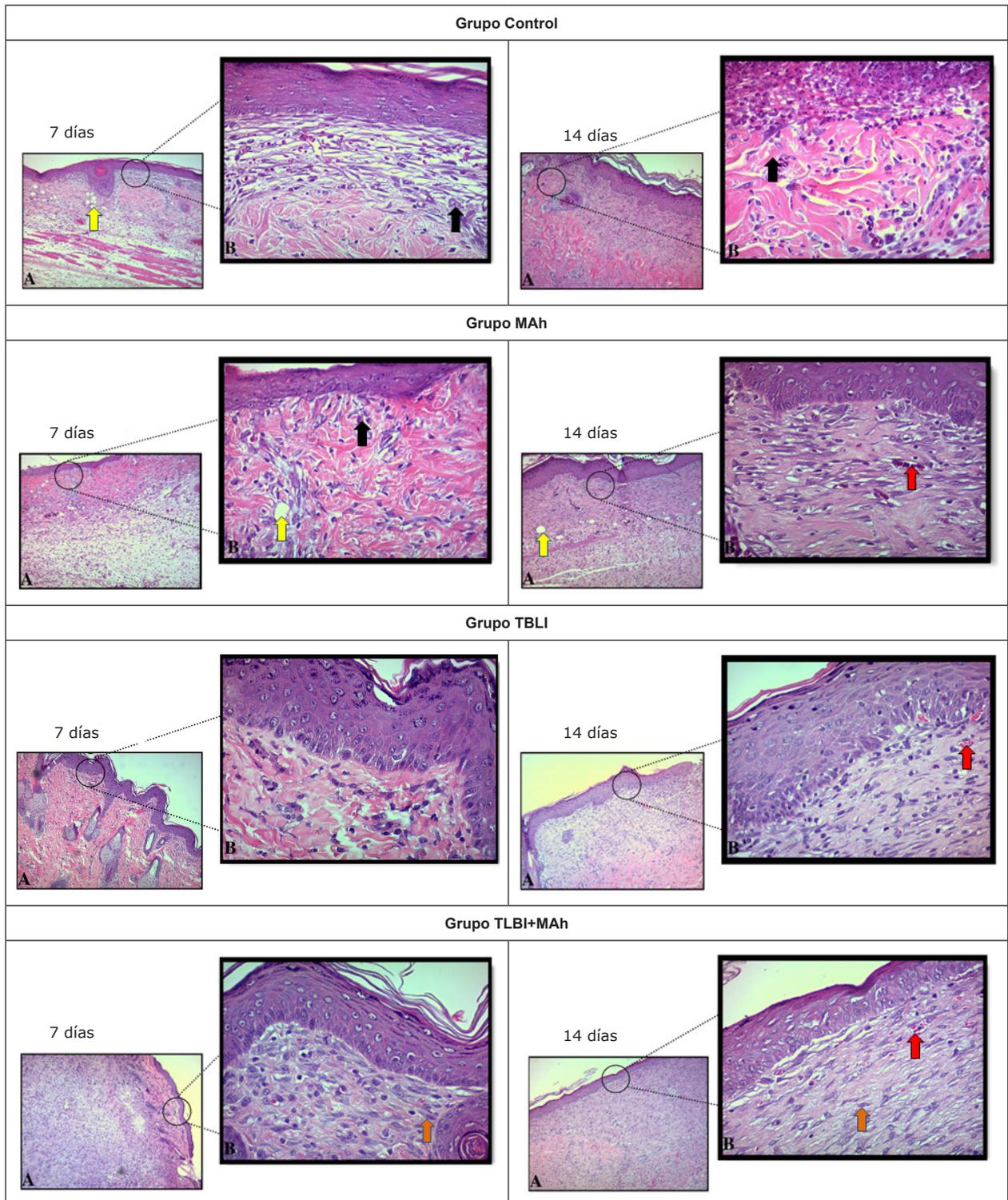
GraphpadPrism V (GraphPad Software, California, EE. UU.) y la prueba de Kolmogorov-Smirnov para analizar la distribución de los datos. Debido a que la presentación fue no paramétrica, se aplicó la prueba de Mann Whitney en el análisis intragrupo. Para la comparación entre los grupos, se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis con polvos de Dunn's Multiple Comparison Test (comparaciones múltiples - análisis intergrupo). Se consideró un intervalo de confianza del 95% y un nivel de significación del 5% ($p < 0,05$). Los datos se presentan como media \pm error estándar (de la media).

Aspectos éticos

Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación de la Universidad del Vale de Paraíba (2.077.418) para el uso de la MAH y por el Comité de Ética en Experimentación Animal del Centro Universitario UNINOVAFAPI n.º 005P/V2/2017, siguiendo las recomendaciones propuestas por la resolución 446/2012 del Consejo Nacional de Salud brasileño (CNS).

Resultados

La evaluación de las fotomicrografías de los portaobjetos histológicos teñidos con H&E muestran la progresión de la cicatrización de las heridas después de las quemaduras de espesor parcial superficiales en todos los grupos y tiempos del experimento (Figura 1).



Aumento abajo A (10X) y más alto B (40X)

Las flechas rojas señalan vasos sanguíneos, las flechas amarillas áreas de edema, las flechas negras infiltrados inflamatorios y las flechas naranjas fibroblastos.

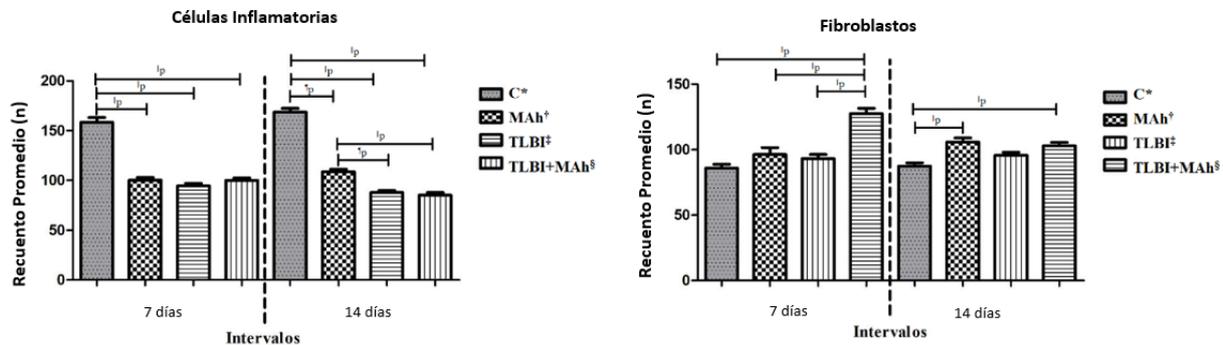
Figura 1 - Microfotografías que muestran los cambios histopatológicos en las quemaduras de espesor parcial superficiales en las ratas de los grupos C, TLBI, MAh y TLBI+MAh a los siete y catorce días. Teresina, PI, Brasil, 2022

El uso de la TLBI combinada con la MAh disminuyó significativamente el número de células inflamatorias en comparación con los otros protocolos de tratamiento. En el análisis intergrupar, se observó que el grupo C presentó el mayor promedio de células inflamatorias en los períodos analizados. A los 14 días hubo diferencia

estadística entre los animales del grupo TLBI+ MAh y los animales del grupo C y los del grupo MAh, fundamentalmente, en lo que respecta a la reducción del número de células inflamatorias en los animales del grupo TLBI+ MAh (Figura 2).

Hubo un aumento en el número de fibroblastos en el grupo TLBI+ MAh en comparación con el de los grupos C, MAh y TLBI a los 7 días. El día 14, los animales de los

grupos TLBI+MAh y MAh presentaron medias superiores en comparación con los demás grupos (Figura 2).



Prueba de Kruskal-Wallis aplicada con polvos de Dunn's Multiple Comparison Test (comparaciones múltiples - análisis intergrupo)

*C = Grupo Control; †MAh = Grupo Membrana Amniótica Humana; ‡TLBI = Grupo Terapia Láser de Baja Intensidad; §TLBI+MAh = Grupo Terapia Láser de Baja Intensidad combinada con Membrana Amniótica Humana; †p = Diferencia extremadamente significativa ($p < 0,0001$); *p = Diferencia significativa ($p < 0,05$)

Figura 2 – Efecto de la fotobiomodulación con TLBI continua (660 nm) aplicada sola y combinada con MAh sobre el recuento promedio de fibroblastos y células inflamatorias en quemaduras de espesor parcial superficiales. Teresina, PI, Brasil, 2022

El análisis intragrupo de células inflamatorias mostró que solo los grupos TLBI y TLBI+MAh mostraron diferencias estadísticamente significativas. En cuanto

al promedio de fibroblastos, se observaron valores estadísticamente significativos en los grupos MAh y TLBI+MAh (Tabla 1).

Tabla 1 - Análisis histopatológico intragrupo del promedio del recuento de células inflamatorias y fibroblastos (media \pm error estándar) después del tratamiento con TLBI (660 nm), MAh y terapia combinada (TLBI + MAh) a los 7 y 14 días después de las quemaduras térmicas de espesor parcial superficiales en ratones ($n = 48$). Teresina, PI, Brasil, 2022

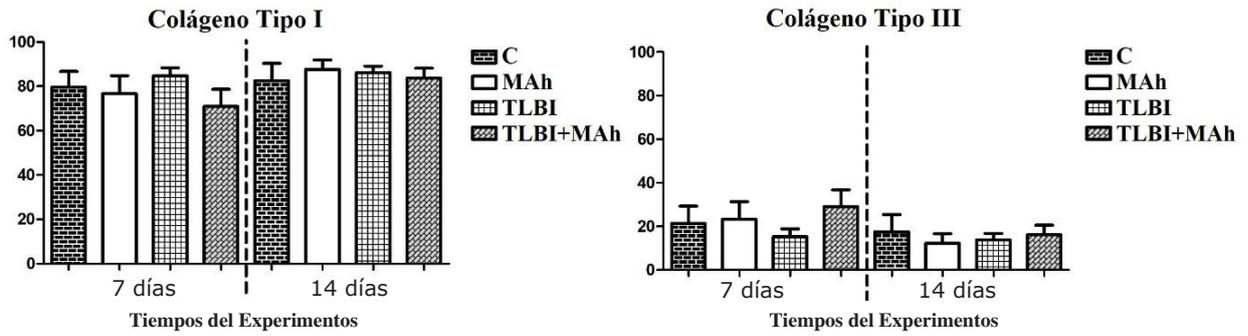
Grupos	Células Inflamatorias			Fibroblastos		
	Tiempos del Experimento			Tiempos del Experimento		
	7 días	14 días	p*	7 días	14 días	p*
Control	158,4 \pm 4,92	168,8 \pm 3,64	ns†	85,8 \pm 3,05	87,5 \pm 2,42	ns†
MAh	100,5 \pm 2,53	108,8 \pm 2,40	ns†	96,2 \pm 6,23	105,8 \pm 5,31	p‡
TLBI	94,6 \pm 2,43	87,5 \pm 2,12	p‡	102,9 \pm 2,56	97,04 \pm 2,82	ns†
TLBI + MAh	99,42 \pm 2,451	85,24 \pm 2,64	p‡	134,4 \pm 3,30	93,21 \pm 3,04	p§

Prueba de Mann Whitney aplicada para el análisis intragrupo.

*p = Nivel de Significación; †ns = Diferencia no significativa; ‡p = Diferencia significativa ($p < 0,05$); §p = Diferencia extremadamente significativa ($p < 0,0001$)

No hubo diferencia en el porcentaje de colágeno tipo I y tipo III (%) en los períodos analizados entre los grupos experimentales. Sin embargo, en comparación

con el grupo C, hubo un ligero aumento del Colágeno tipo III en el grupo TLBI+MAh al séptimo día, aunque sin significación estadística (Figura 3).



Prueba de Kruskal-Wallis aplicada con polvos de Dunn's Multiple Comparison Test (comparaciones múltiples - análisis intergrupo).

Figura 3 – Representación gráfica del efecto de la fotobiomodulación con TLBI y membrana amniótica, aplicadas solas o combinadas, sobre el porcentaje de colágeno tipo III y I en quemaduras de espesor parcial superficiales en ratas Wistar (n = 48). Teresina, PI, Brasil, 2022

Evaluación de fotomicrografías de preparaciones histológicas teñidas con picosirius que muestran las fibras de colágeno tipo I y III de las lesiones después de las

quemaduras parciales superficiales en todos los grupos y tiempos del experimento (Figura 4).

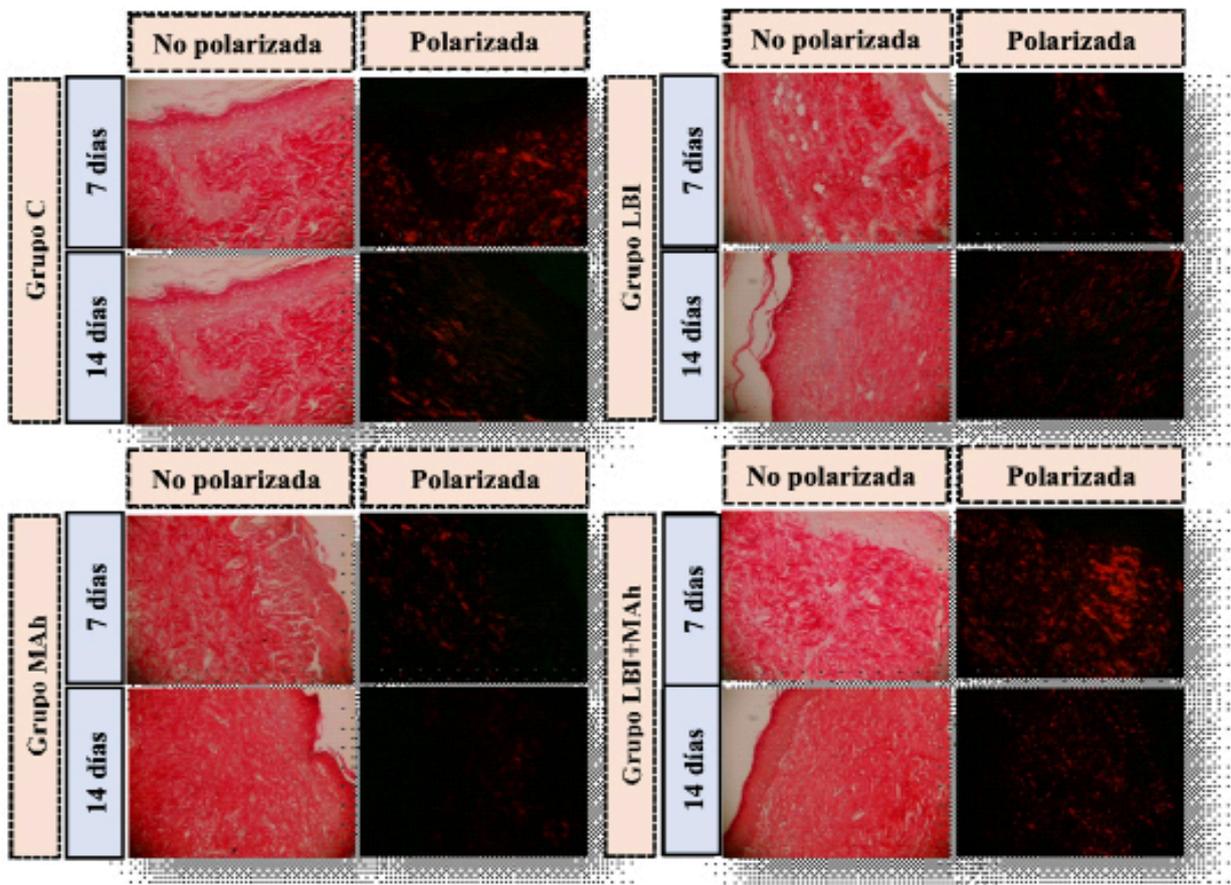


Figura 4 – Fotomicrografías observadas con luz polarizada y no polarizada que muestran las fibras de colágeno tipo I y III en las quemaduras de espesor parcial superficiales en ratas Wistar de los grupos C, MAh, TLBI y TLBI+ MAh a los siete y catorce días, objetivo 10X (n = 48). Teresina, PI, Brasil, 2022

Discusión

El uso de ratas en investigaciones experimentales que involucran la reparación de tejidos en quemaduras es frecuente, sobre todo porque tienen una composición cutánea (epidermis y dermis) similar a la de la piel humana, además, tienen bajo costo y tiempo de cicatrización corto. Sin embargo, la morfología de la piel de los roedores es única y se diferencia de la arquitectura de la piel humana por presentar baja adherencia a las estructuras subyacentes, presencia de la enzima l-gluconolactona que convierte la l-glucono-gamma lactona en vitamina C, cicatrización por contracción de la herida y menor riesgo de infección⁽¹⁸⁾.

Este estudio investiga la combinación de fotobiomodulación (TLBI) con MAh para el tratamiento de lesiones por quemaduras parciales superficiales inducidas experimentalmente en ratas. Esta investigación evaluó la reparación tisular en estas lesiones y describe la evolución del proceso de cicatrización utilizando las terapias solas y combinadas en los tiempos del experimento de 7 y 14 días.

Hay estudios clínicos y experimentales publicados que utilizaron la TLBI para la cicatrización de heridas agudas y crónicas, sin embargo, existen pocos informes sobre el uso de esta tecnología combinada con otras terapias en quemaduras parciales superficiales y no hay ningún estudio que utilice MAh como adyuvante en el tratamiento^(7,10-11,19).

En nuestra investigación se verificó que en los tiempos de experimento hubo una reducción significativa de células inflamatorias en todos los grupos tratados en comparación con el grupo control. Sin embargo, se observó que, si bien las terapias son efectivas en la reducción de la inflamación, la combinación de terapias TLBI + MAh fue más efectiva que el uso de cada una por separado, esto demuestra los efectos aditivos en la modulación de la actividad inflamatoria que puede generar el tratamiento combinado. Considerando que los efectos antiinflamatorios del uso aislado de estas terapias sobre las quemaduras ya están descritos en la literatura, nuestros hallazgos demuestran que el uso combinado de las mismas potencia la actividad inflamatoria. Tales hallazgos también sugieren que la terapia combinada actúa armónicamente y que la MAh funcionaría como un sustrato biológico, cuya acción se potencia gracias a que la luz irradiada crea un microambiente propicio para la oxigenación, el crecimiento y la modulación celular.

Encontramos que todas las terapias (solas y combinadas) fueron efectivas en la reducción de células inflamatorias en los dos tiempos del experimento, tales hallazgos revelan la importancia que tiene el uso temprano de las mismas para que el proceso de reparación tisular ocurra sin demoras. Un estudio con heridas

agudas inducidas reveló que la inflamación exacerbada y prolongada perjudica el proceso de reepitelización al modificar la formación del tejido de granulación, lo que aumenta la posibilidad de que se formen cicatrices⁽²⁰⁾.

Cabe mencionar que, en el análisis intergrupar del segundo período experimental, la combinación TLBI+MAh fue extremadamente efectiva en comparación con las terapias aplicadas por separado. Además, la TLBI sola fue más eficaz para reducir el número medio de células inflamatorias que el tratamiento de quemaduras solo con MAh.

La fotobiomodulación con TLBI se ha utilizado para reducir la inflamación, reducir el dolor y el edema, y preservar y restaurar los tejidos dañados por una lesión. Estos efectos se pueden lograr utilizando longitudes de onda entre 600 y 1000 nm⁽²¹⁾. Otros estudios clínicos y experimentales con quemaduras de espesor parcial y total han utilizado fotobiomodulación con TLBI con longitud de onda de 660 nm, lo que coincide con la elección del parámetro que se realizó en nuestro estudio^(5,19,22-23).

Un estudio reciente que utilizó el mismo protocolo de irradiación que la TLBI observó que hubo una modulación de la respuesta inflamatoria en la cicatrización de injertos de piel en ratas⁽²⁴⁾, esos resultados son similares a los que arrojó el presente estudio. Además, al igual que nuestros hallazgos, la literatura señala los efectos del uso de una única dosis de TLBI, entre ellos, la aceleración de la fase inflamatoria en la reparación de la piel⁽²²⁾.

Se sabe que la inflamación y la angiogénesis son factores importantes para determinar la cicatrización de heridas y que la reducción de la inflamación permite una mayor angiogénesis. Por ende, en investigaciones con TLBI se presentan propiedades como modular los niveles de inflamación y proliferación celular⁽²⁵⁻²⁶⁾.

En lo que respecta a la asociación de la TLBI con otras terapias para el tratamiento de quemaduras, un estudio que utilizó esta herramienta combinada con miel medicinal obtuvo como resultados atenuación de la inflamación y del dolor en la cicatrización de las quemaduras y aceleración del proceso de reparación caracterizado por el aumento de la proliferación celular⁽⁷⁾, que son los mismos efectos que tuvo el protocolo de terapia de asociación utilizado en nuestro estudio.

Cabe destacar que, para el tratamiento de quemaduras de espesor parcial superficiales, los apósitos ideales son aquellos que tienen la capacidad de conservar el calor, proporcionar humedad, evitar la contaminación por microorganismos, ser seguros y no adherirse a la lesión ni requerir cambios frecuentes⁽²⁷⁾. Por lo tanto, la MAh sobresale por ser un biomaterial que reúne todas las características enumeradas⁽¹²⁾.

La MAh se ha aplicado en heridas agudas y crónicas, como lo demuestran los prometedores resultados obtenidos

con la aplicación de este biomaterial en la cicatrización de estas lesiones debido a sus propiedades⁽²⁸⁻²⁹⁾. Cabe destacar que, los apósitos utilizados con este biomaterial o en combinación con otros productos pueden facilitar la proliferación de fibroblastos y contribuir a la liberación de factores angiogénicos⁽³⁰⁾.

En cuanto al análisis intergrupal, con respecto a la proliferación de fibroblastos, nuestros resultados muestran que la combinación TLBI+MAh fue efectiva en los dos tiempos del experimento. Cabe destacar que, la fibroplasia se vio beneficiada por el uso de terapias combinadas, dado que, en la fase inicial del experimento, la MAh pudo haber modulado la acción de la TLBI, potenciando el proceso de activación celular y, por ende, provocar el inicio temprano de la fase proliferativa, que se caracteriza por un aumento extremadamente significativo de fibroblastos en comparación con todos los demás grupos experimentales. Este hecho demuestra la gran capacidad reparadora del tejido quemado que tiene el tratamiento con terapias combinadas.

Los estudios muestran una respuesta biológica que favorece el proceso de reparación de los tejidos al estimular la proliferación de fibroblastos y también se ha demostrado una mejora en la microcirculación en el caso de la fotobiomodulación con TLBI⁽³¹⁻³³⁾.

Los datos obtenidos en nuestro estudio comprueban las propiedades beneficiosas que tiene el uso de la TLBI y de la MAh informadas en estudios previos, ya sea por separado o combinadas con otros productos^(7,30-34). No obstante, demostramos que la combinación de terapias (TLBI y MAh) en quemaduras puede presentar excelentes resultados, debido a la suma de efectos moduladores y protectores en las diferentes fases de la reparación tisular.

Considerando la complejidad del proceso de cicatrización en las quemaduras, nuestros resultados se presentan como una fase preclínica que incentiva la expansión de las técnicas de evaluación de los efectos determinados por la combinación de la TLBI con la MAh, con el fin de detectar más información sobre la interacción de la fotobiomodulación con el biomaterial, con el objetivo de que en el futuro se introduzca esta terapia combinada en protocolos clínicos para el tratamiento de quemaduras de espesor parcial superficiales.

En nuestro estudio no hubo significancia estadística para el porcentaje de colágeno tipo I y III en los periodos analizados, aunque en las microfotografías se observó una progresión en el proceso de organización celular en los grupos de tratamiento. Por ende, sugerimos extender el tiempo del experimento para abarcar toda la dinámica del proceso de reparación. Por otro lado, se considera una limitación del estudio el hecho de no haber realizado la medición de la lesión, lo que limita el seguimiento de la contracción de la herida. Además, no se utilizaron

marcadores inmunológicos, importantes evaluadores de reacciones tisulares y reacciones bioquímicas intrínsecas de la reparación tisular.

Conclusión

Nuestro estudio demostró que la fotobiomodulación con láser de baja intensidad a 660 nm actúa sinérgicamente con la aplicación tópica de la membrana amniótica humana, constituyendo un protocolo terapéutico eficaz en el tratamiento de quemaduras de espesor parcial superficiales. La combinación de terapias potenció los efectos antiinflamatorios y la estimulación de la proliferación celular, acelerando el proceso de reparación de los tejidos.

Referencias

1. World Health Organization. Burns fact sheet [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2018 [cited 2021 Apr 01]. Available from: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/burns>
2. Santos JV, Souza J, Amarante J, Freitas A. Burden of Burns in Brazil from 2000 to 2014: A Nationwide Hospital-Based Study. *World J Surg.* 2017;41(8):2006-12. <https://doi.org/10.1007/s00268-017-3988-5>
3. Zhang X, Wei X, Liu L, Marti GP, Ghanamah MS, Arshad MJ, et al. Association of increasing burn severity in mice with delayed mobilization of circulating angiogenic cells. *Arch Surg.* 2010;145(3):259-66. <https://doi.org/10.1001/archsurg.2009.285>
4. Abazari M, Ghaffari A, Rashidzadeh H, Badeleh SM, Maleki Y. A Systematic Review on Classification, Identification, and Healing Process of Burn Wound Healing. *Int J Low Extrem Wounds.* 2020;11:1534734620924857. <https://doi.org/10.1177/1534734620924857>
5. Brassolatti P, Bossini PS, Kido HW, Oliveira MCD, Almeida-Lopes L, Zanardi LM, et al. Photobiomodulation and bacterial cellulose membrane in the treatment of third-degree burns in rats. *J Tissue Viability.* 2018;27(4):249-56. <https://doi.org/10.1016/j.jtv.2018.10.001>
6. Saavedra PA, Brito ES, Areda CA, Escalda PM, Galato D. Burns in the Brazilian Unified Health System: a review of hospitalization from 2008 to 2017. *Int J Burns Trauma* [Internet]. 2019 [cited 2021 Apr 1];15;9(5):88-98. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6874777/>
7. Yadav A, Verma S, Keshri GK, Gupta A. Combination of medicinal honey and 904 nm superpulsed laser-mediated photobiomodulation promotes healing and impedes inflammation, pain in full-thickness burn. *J Photochem Photobiol B.* 2018;186:152-9. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.07.008>

8. Murray RZ, West ZE, Cowin AJ, Farrugia BL. Development and use of biomaterials as wound healing therapies. *Burns Trauma*. 2019 Jan 25;7:2. <https://doi.org/10.1186/s41038-018-0139-7>.
9. Lamaro-Cardoso A, Bachion MM, Morais JM, Fantinati MS, Milhomem AC, Almeida VL, et al. Photobiomodulation associated to cellular therapy improve wound healing of experimental full thickness burn wounds in rats. *J Photochem Photobiol B*. 2019;194:174-82. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.04.003>
10. Nilforoushzadeh MA, Kazemikhoo N, Mokmeli S, Zare S, Dahmardehei M, Vaghar Doost R, et al. An Open-Label Study of Low-Level Laser Therapy Followed by Autologous Fibroblast Transplantation for Healing Grade 3 Burn Wounds in Diabetic Patients. *J Lasers Med Sci*. 2019;10(Suppl 1):S7-S12. <https://doi.org/10.15171/jlms.2019.S2>
11. Vaghardoost R, Momeni M, Kazemikhoo N, Mokmeli S, Dahmardehei M, Ansari F, et al. Effect of low-level laser therapy on the healing process of donor site in patients with grade 3 burn ulcer after skin graft surgery (a randomized clinical trial). *Lasers Med Sci*. 2018;33(3):603-7. <https://doi.org/10.1007/s10103-017-2430-4>
12. Gholipourmalekabadi M, Farhadhosseinabadi B, Faraji M, Nourani MR. How preparation and preservation procedures affect the properties of amniotic membrane? How safe are the procedures? *Burns*. 2020 Sep;46(6):1254-71. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2019.07.005>
13. Raza MS, Asif MU, Abidin ZU, Khalid FA, Ilyas A, Tarar MN. Glycerol Preserved Amnion: A Viable Source of Biological Dressing for Superficial Partial Thickness Facial Burns. *J Coll Physicians Surg Pak*. 2020;30(4):394-8. <https://doi.org/10.29271/jcpsp.2020.04.394>
14. Ahuja N, Jin R, Powers C, Billi A, Bass K. Dehydrated Human Amnion Chorion Membrane as Treatment for Pediatric Burns. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2020 Nov;9(11):602-11. <https://doi.org/10.1089/wound.2019.0983>
15. Lashgari MH, Rostami MHH, Omid Etamad O. Assessment of outcome of using amniotic membrane enriched with stem cells in scar formation and wound healing in patients with burn wounds. *Bali Med J*. 2019;8(1):41-6. <https://doi.org/10.15562/bmj.v8i1.1223>
16. Sant'Anna LB, Cargnoni A, Ressel L, Vanosi G, Parolini O. Amniotic membrane application reduces liver fibrosis in a bile duct ligation rat model. *Cell Transplant*. 2011;20(3):441-53. <https://doi.org/10.3727/096368910X522252>
17. Sant'Anna LB, Hage R, Cardoso MA, Arisawa EA, Cruz MM, Parolini O, et al. Antifibrotic Effects of Human Amniotic Membrane Transplantation in Established Biliary Fibrosis Induced in Rats. *Cell Transplant*. 2016;13;25(12):2245-57. <https://doi.org/10.3727/096368916X692645>
18. Abdullahi A, Amini-Nik S, Jeschke M. G. Animal models in burn research. *Cell Mol Life Sci*. 2014;71(17):3241-55. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1612-5>
19. Allban AAH, Munahi AK, Kadhim A, Alzamili SKN. Low-Level Laser Therapy (Two Different Wavelengths 660nm and 820nm) Compared with *Nigella sativa* Oil for Treatment of Burns in Rats. *J Int Pharma Res [Internet]*. 2019 [cited 2021 Apr 1];46(4):346-52. Available from: https://www.researchgate.net/publication/349181330_Low_Level_Laser_Therapy_Two_Different_Wavelengths_660nm_and_820nm_Compared_with_Nigella_Sativa_Oil_for_Treatment_of_Burns_in_Rats
20. Qian LW, Fourcaudot AB, Yamane K, You T, Chan RK, Leung KP. Exacerbated and prolonged inflammation impairs wound healing and increases scarring. *Wound Repair Regen*. 2016 Jan-Feb;24(1):26-34. <https://doi.org/10.1111/wrr.12381>.
21. Huang YY, Sharma SK, Carroll J, Hamblin MR. Biphasic dose response in low level light therapy - an update. *Dose Response*. 2011;9(4):602-18. <https://doi.org/10.2203/dose-response.11-009.Hamblin>
22. Andrade ALM, Brassolatti P, Luna GF, Parisi JR, Oliveira AML, Frade MAC, et al. Effect of photobiomodulation associated with cell therapy in the process of cutaneous regeneration in third degree burns in rats. *J Tissue Eng Regen Med*. 2020;14(5):673-83. <https://doi.org/10.1002/term.3028>
23. Amadio EM, Marcos RL, Serra AJ, Santos SA, Caires JR, Fernandes GHC, et al. Effect of photobiomodulation therapy on the proliferation phase and wound healing in rats fed with an experimental hypoproteic diet. *Lasers Med Sci*. 2021;36(7):1427-35. <https://doi.org/10.1007/s10103-020-03181-1>
24. Moreira SH, Pazzini JM, Alvarez JLG, Cassino PC, Bustamante CC, Bernardes FJL, et al. Evaluation of angiogenesis, inflammation, and healing on irradiated skin graft with low-level laser therapy in rats (*Rattus norvegicus albinus* wistar). *Lasers Med Sci*. 2020;35(5):1103-9. <https://doi.org/10.1007/s10103-019-02917-y>
25. Rathnakar B, Rao BS, Prabhu V, Chandra S, Rai S, Rao AC, et al. Photo-biomodulatory response of low-power laser irradiation on burn tissue repair in mice. *Lasers Med Sci*. 2016;31(9):1741-50. <https://doi.org/10.1007/s10103-016-2044-2>
26. Gupta A, Keshri GK, Yadav A, Gola S, Chauhan S, Salhan AK, et al. Superpulsed (Ga-As, 904 nm) low-level laser therapy (LLLT) attenuates inflammatory response and enhances healing of burn wounds. *J Biophotonics*. 2015;8(6):489-501. <https://doi.org/10.1002/jbio.201400058>

27. ISBI Practice Guidelines Committee; Steering Subcommittee; Advisory Subcommittee. ISBI Practice Guidelines for Burn Care. *Burns*. 2016 Aug;42(5):953-1021. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2016.05.013>
28. Han LG, Zhao QL, Yoshida T, Okabe M, Soko C, Rehman MU, et al. Differential response of immortalized human amnion mesenchymal and epithelial cells against oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 2019;135:79-86. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.02.017>
29. Campelo MBD, Santos JAF, Maia ALM Filho, Ferreira DCL, Sant'Anna LB, Oliveira RA, et al. Effects of the application of the amniotic membrane in the healing process of skin wounds in rats. *Acta Cir Bras*. 2018;33(2):144-55. <https://doi.org/10.1590/s0102-865020180020000006>
30. Rahman MS, Islam R, Rana MM, Spitzhorn LS, Rahman MS, Adjaye J, et al. Characterization of burn wound healing gel prepared from human amniotic membrane and *Aloe vera* extract. *BMC Complement Altern Med*. 2019;19(1):115. <https://doi.org/10.1186/s12906-019-2525-5>
31. Ranjbar R, Takhtfooladi MA. The effects of low level laser therapy on *Staphylococcus aureus* infected third-degree burns in diabetic rats. *Acta Cir Bras*. 2016;31(4):250-5. <https://doi.org/10.1590/S0102-865020160040000005>
32. Hashmi JT, Huang YY, Osmani BZ, Sharma SK, Naeser MA, Hamblin MR. Role of low-level laser therapy in neurorehabilitation. *PM R*. 2010;2(12 Suppl 2):S292-S305. <https://doi.org/10.1016/j.pmrj.2010.10.013>
33. Ihsan FR. Low-level laser therapy accelerates collateral circulation and enhances microcirculation. *Photomed Laser Surg*. 2005 Jun;23(3):289-94. <https://doi.org/10.1089/pho.2005.23.289>
34. Kshersagar J, Kshirsagar R, Desai S, Bohara R, Joshi M. Decellularized amnion scaffold with activated PRP: a new paradigm dressing material for burn wound healing. *Cell Tissue Bank*. 2018;19(3):423-36. <https://doi.org/10.1007/s10561-018-9688-z>

Contribución de los autores

Concepción y dibujo de la pesquisa: Fernanda Cláudia Miranda Amorim, Emilia Ângela Loschiavo Arisawa, Luciana Barros Sant'anna. **Obtención de**

datos: Fernanda Cláudia Miranda Amorim, Ana Beatriz Mendes Rodrigues. **Análisis e interpretación de los datos os:** Fernanda Cláudia Miranda Amorim, Emilia Ângela Loschiavo Arisawa, Luciana Barros Sant'anna, Ana Beatriz Mendes Rodrigues, Davidson Ribeiro Costa. **Análisis estadístico:** Fernanda Cláudia Miranda Amorim, Ana Beatriz Mendes Rodrigues, Davidson Ribeiro Costa. **Redacción del manuscrito:** Fernanda Cláudia Miranda Amorim, Emilia Ângela Loschiavo Arisawa, Luciana Barros Sant'anna, Ana Beatriz Mendes Rodrigues, Davidson Ribeiro Costa. **Revisión crítica del manuscrito en cuanto al contenido intelectual importante:** Fernanda Cláudia Miranda Amorim, Emilia Ângela Loschiavo Arisawa, Luciana Barros Sant'anna, Ana Beatriz Mendes Rodrigues, Davidson Ribeiro Costa.

Todos los autores aprobaron la versión final del texto.

Conflicto de intereses: los autores han declarado que no existe ningún conflicto de intereses.

Recibido: 07.07.2021
Aceptado: 08.07.2022

Editor Asociado:
Ricardo Alexandre Arcêncio

Copyright © 2023 Revista Latino-Americana de Enfermagem
Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos de la Licencia Creative Commons CC BY.

Esta licencia permite a otros distribuir, mezclar, ajustar y construir a partir de su obra, incluso con fines comerciales, siempre que le sea reconocida la autoría de la creación original. Esta es la licencia más servicial de las ofrecidas. Recomendada para una máxima difusión y utilización de los materiales sujetos a la licencia.

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