

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIAS E SAÚDE

LILIAN DE ARAUJO PRADAL

**EFEITOS DA FOTOBIMODULAÇÃO E DO USO DE CREME A BASE DE SERICINA
EM LESÕES EXPERIMENTAIS POR QUEIMADURA DE 2º GRAU EM RATOS
WISTAR**

Orientador: Professor Doutor Gladson
Ricardo Flor Bertolini

CASCADEL-PR
(julho/2025)

LILIAN DE ARAUJO PRADAL

**EFEITOS DA FOTOBIMODULAÇÃO E DO USO DE CREME A BASE DE SERICINA
EM LESÕES EXPERIMENTAIS POR QUEIMADURA DE 2º GRAU EM RATOS
WISTAR**

DEFESA apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde – Doutorado, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Biociências e Saúde.

Área de concentração: Processo saúde-doença.

ORIENTADOR: Gladson Ricardo Flor Bertolini.

COORIENTADOR: Rose Meire Costa.

CASCADEL-PR

(julho/2025)

RESUMO

As queimaduras de segundo grau estão entre as lesões cutâneas mais comuns, caracterizando-se por dor intensa e alta sensibilidade. Estudos prévios *in vitro* demonstraram que a sericina estimula a migração de fibroblastos e pode favorecer a reepitelização da lesão. Já a fotobiomodulação, cujo efeito anti-inflamatório é amplamente reconhecido, também apresenta potencial terapêutico. Assim, foram analisados tanto o uso isolado de cada uma dessas abordagens quanto a associação entre elas, com o objetivo de investigar sua contribuição para a recuperação de queimaduras de segundo grau induzidas experimentalmente. Para tanto, foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar, aleatorizados em seis grupos: um controle (CON), que não receberá nenhum tratamento; um grupo tratado com pomada de sulfadiazina de prata (SUL); um tratado com creme de sericina (SER); um tratado com fotobiomodulação por laser de baixa potência (LBP); um grupo tratado com sulfadiazina e laser (SUL+LBP), além de um grupo tratado com sericina e laser (SER+LBP). Cada grupo contou com 20 animais, com 12 semanas de idade e aproximadamente 350g. Dessa forma, os grupos foram subdivididos, sendo metade dos animais eutanasiados após 7 dias (D7) e a outra metade após 14 dias (D14) da indução da lesão. A queimadura foi provocada pelo contato de um instrumento metálico previamente aquecido em chama direta com a pele do animal anestesiado, por um período de 3 segundos. Ademais, foram realizadas avaliação macroscópica por fotografia, termografia por meio de fototermografia e histomorfometria da pele íntegra e lesionada. Efetivou-se, ainda, uma revisão sistemática com meta-análise, considerando artigos que reportam a utilização de fotobiomodulação no tratamento de queimaduras. Para a análise estatística, foi realizado o teste de modelos lineares generalizados e $p=0,05$. Não foram encontradas diferenças estatísticas com relação à área da lesão entre os grupos de 7 dias; além disso, houve diferença estatística ($p<0,05$) entre os grupos CON e LBP para os demais, já que apresentaram redução da área queimada. Houve diferença estatística entre as avaliações AV0 e AV1 na análise de temperatura da superfície da lesão nos grupos de 7 e 14 dias ($p>0,05$). Não houve, porém, diferença para a análise de escala de formação de tecido de granulação entre nenhum grupo. Com relação ao depósito de colágeno, os grupos SER, LBP, SUL+LBP e SER+LBP foram diferentes do controle CON, com maior pontuação na escala utilizada ($p<0,05$); o grupo SER+LBP também apresentou maior porcentual de colágeno tipo I, sendo diferente estatisticamente dos demais grupos ($p<0,05$). Nas análises moleculares, dos grupos de 14 dias, houve redução na concentração de TNF α , TBARS e CAT ($p<0,05$), especialmente nos tratamentos combinados com LBP, o que indica redução do estresse oxidativo. O estudo apontou, assim, uma melhora no processo de cicatrização tecidual, sendo que novas análises poderiam elucidar ainda mais os mecanismos de reparação da pele dos animais analisados.

Palavras-Chaves: Queimaduras. Sericina. Terapia com luz de baixa intensidade. Terapêutica.

ABSTRACT

Effects of Photobiomodulation and Sericin-based Cream on Experimental Second-Degree Burn Lesions in Wistar Rats

Second-degree burns are among the most common skin injuries, characterized by intense pain and high sensitivity. Previous *in vitro* studies have shown that sericin stimulates fibroblast migration and may favor lesion re-epithelialization. Photobiomodulation, whose anti-inflammatory effect is widely recognized, also presents therapeutic potential. Thus, both the isolated use of each of these approaches and their association were analyzed, with the objective of investigating their contribution to the recovery of experimentally induced second-degree burns. For this purpose, male Wistar rats were randomized into six groups: a control group (CON) that received no treatment; a group treated with silver sulfadiazine ointment (SUL); a group treated with sericin cream (SER); a group treated with low-level laser photobiomodulation (LBP); a group treated with sulfadiazine and laser (SUL+LBP); and a group treated with sericin and laser (SER+LBP). Each group consisted of 20 animals, 12 weeks old and approximately 350g. The groups were subdivided, with half of the animals euthanized after 7 days (D7) and the other half after 14 days (D14) following lesion induction. The burn was caused by contact with a metal instrument previously heated in a direct flame with the anesthetized animal's skin for a period of 3 seconds. Macroscopic evaluation by photography, thermography by photothermography, and histomorphometry of intact and lesioned skin were performed. A systematic review with meta-analysis was also conducted, considering articles that report the use of photobiomodulation in burn treatment. For statistical analysis, the generalized linear models test was performed with $p=0.05$. No statistical differences were found regarding lesion area among the 7-day groups; however, there was a statistical difference ($p<0.05$) between the CON and LBP groups and the others, as they presented a reduction in burned area. There was a statistical difference between the AV0 and AV1 evaluations in the analysis of lesion surface temperature in the 7- and 14-day groups ($p>0.05$). However, there was no difference in the analysis of granulation tissue formation scale among any group. Regarding collagen deposition, the SER, LBP, SUL+LBP, and SER+LBP groups were different from the CON control group, with higher scores on the scale used ($p<0.05$); the SER+LBP group also presented a higher percentage of type I collagen, being statistically different from the other groups ($p<0.05$). In the molecular analyses of the 14-day groups, there was a reduction in $\text{TNF}\alpha$, TBARS, and CAT concentrations ($p<0.05$), especially in the treatments combined with LBP, indicating a reduction in oxidative stress. The study pointed to an improvement in the tissue healing process, and further analyses could further elucidate the mechanisms of skin repair in the analyzed animals.

Key-words: Burns. Sericin. Photobiomodulation. Therapy.

LISTA DE ABREVIATURAS

BAX – BCL-2 associado X regulador de apoptose

CAT - Catalase

CCO – Citocromo C-oxidase

CEUA - Comitê de Ética Animal

DNA- Ácido Desoxirribonucleico

EGF – Fator de Crescimento Epidérmico

RNS – Espécies Reativas de Nitrogênio

ROS - Espécies Reativas de Oxigênio

HE - Hematoxilina-Eosina

HGF – Fator de Crescimento Fibroblástico

Hsp70 – Proteína de choque térmico de 70 quilodaltons

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

GPx – Glutathione peroxidase

IGF – Fator de Crescimento Tipo Insulínico

IL - Interleucina

J/cm² - Joules por centímetro quadrado

LABEF- Laboratório de Biologia Estrutural e Funcional

LBP – Laser de Baixa Potência

LELRF- Laboratório de Estudo das Lesões e Recursos Fisioterapêuticos

MDA – Malonaldeídos

Nrf2 – Fator nuclear eritróide-2

O²⁻ – Superóxido

OH⁻ - Hidroxila

PDGF – Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas

RNA- Ácido Ribonucleico

SOD – Superóxido dismutase

TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TGF β – Fator de Crescimento Transformante β

TIMP – Inibidores de Metaloproteinases

TNF α – Fator de Necrose Tumoral α

UVB – Raios Ultravioleta B

VEGF – Fator de Crescimento Endotelial Vascular

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	5
2. OBJETIVOS	8
2.1 Objetivos Gerais	8
2.2 Objetivos Específicos	8
3.0. REVISÃO DE LITERATURA	9
4. METODOLOGIA	28
4.1- ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS	28
4.2. MODELO EXPERIMENTAL DE QUEIMADURA DE 2º GRAU	31
4.3. PROTOCOLO DE TRATAMENTO COM SERICINA	32
4.4. PROTOCOLO DE TRATAMENTO COM SULFADIAZINA DE PRATA	33
4.5. PROTOCOLO DE TRATAMENTO COM FOTOBIMODULAÇÃO.....	34
4.6. AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA E DE EPITELIZAÇÃO	35
4.7. AVALIAÇÃO DA TEMPERATURA.....	35
4.9. PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO DA DERME	35
4.10. ANÁLISE DE PERFIL INFLAMATÓRIO	37
4.11. ANÁLISE DO SISTEMA ANTIOXIDANTE	38
4.11.1. Análise do sistema enzimático antioxidante	Error! Bookmark not defined.
4.12. ANÁLISE DE IMUNOFLUORESCÊNCIA.....	Error! Bookmark not defined.
5. RESULTADOS ESPERADOS	40
6. CRONOGRAMA.....	Error! Bookmark not defined.
8. REFERÊNCIAS	5

1. INTRODUÇÃO

A pele é o maior órgão do corpo, o qual realiza múltiplas funções imunológicas, neurossensoriais, metabólicas, homeostase e termorregulação. Quando essa barreira é lesada, tais funções sofrem desequilíbrio e outros sistemas são comprometidos (Boldeanu *et al.*, 2020). Uma das causas de lesões de pele são as lesões por queimadura (Oryan; Alemzadeh; Moshiri, 2017).

A lesão por queimadura é um processo patológico pós-traumático inflamatório, acompanhado por efeitos locais e sistêmicos, que causa intensa resposta inflamatória, danos teciduais estruturais e funcionais (Abdullahi; Amini-Nik; Jeschke, 2014a; Parihar *et al.*, 2008). Essas lesões são classificadas de acordo com a profundidade, tecidos afetados e gravidade. Nas lesões de primeiro grau, apenas a epiderme é afetada, apresentando eritema local e dor ao toque. As queimaduras de segundo grau afetam epiderme e derme, de maneira que são dolorosas e sensíveis ao toque. Nas lesões de terceiro grau, epiderme, derme e hipoderme são afetadas; nas lesões de quarto grau, a destruição chega a tecidos mais profundos, as quais são ocasionadas devido à destruição das terminações nervosas (Evers; Bhavsar; Mailänder, 2010; Oryan; Alemzadeh; Moshiri, 2017; Zuo; Medina; Tredget, 2017).

Quanto à fisiopatologia da queimadura, imediatamente após o trauma, a fase inicial do processo inflamatório recruta neutrófilos e monócitos ao local da lesão, devido à vasodilatação e extravasamento de fluídos ao interstício adjacente, o que produz uma resposta imune sustentada por macrófagos e quimiocitocinas, como Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α), Interleucina-1 (IL-1) e Interleucina-6 (IL-6), elementos centrais desse processo (Rowan *et al.*, 2015b; Tiwari, 2012). O processo inflamatório ainda estimula o metabolismo celular no local da queimadura, o que resulta em maior produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), como superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroxila ($OH^{\cdot}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Essa resposta inflamatória torna-se sistêmica e TNF- α passa a induzir apoptose celular (Nielson *et al.*, 2017).

A definição do melhor tratamento para as lesões é determinada pelo conjunto de variáveis, a saber, profundidade, extensão, localização e causa da queimadura (Nímia *et al.*, 2018). O uso de antibioticoterapia intravenosa possui

limitações, como o alcance do leito da ferida e a toxicidade ao paciente, sendo necessário o uso tópico de agentes, em sua maioria, antimicrobianos, como a sulfadiazina de prata 1%, um dos mais utilizados devido à sua fácil aplicação e baixo custo (Nímia *et al.*, 2018; Rowan *et al.*, 2015b; Tiwari, 2012; Zuo; Medina; Tredget, 2017).

Embora haja a comprovação da eficiência antimicrobiana da sulfadiazina de prata, estudos também apontam que agentes de prata podem apresentar toxidade severa no meio celular; uma vez ionizada, torna-se altamente reativa, o que produz a desnaturação e disfunção das mitocôndrias (Aramwit *et al.*, 2013; Kempf; Kimble; Cuttle, 2011; Nímia *et al.*, 2018; Rowan *et al.*, 2015b).

A sericina, proteína produzida pela *Bombyx mori*, lagarta do bicho-da-seda, tem sido utilizada como uma alternativa nos tratamentos de lesões de pele, por causa da sua constituição de aminoácidos semelhante ao estrato córneo, biocompatibilidade e baixa toxicidade (Kunz *et al.*, 2016).

Quanto à fotobiomodulação através do laser de baixa potência (LBP), segundo Smith (2010), é eficaz para estimular a cicatrização de feridas, redução do processo inflamatório e dor, pela diminuição da permeabilidade vascular e edema. Dessa maneira, efetiva-se como o principal alvo da radiação visível, emitida pelo equipamento, o citocromo C oxidase (COX), localizado nas mitocôndrias (Duarte *et al.*; 2018).

Entretanto, poucos estudos foram realizados quanto ao uso da sericina e da fotobiomodulação como tratamentos em queimaduras e nenhum com a associação de ambos os tratamentos. Isso origina a pergunta de pesquisa: a sericina, como creme tópico, e o laser de baixa potência poderiam ser terapias efetivas como indutores da resolução das lesões por queimaduras de segundo grau?

Assim, acredita-se que a sericina em forma de creme tópico poderá ocasionar a melhora dos aspectos morfofisiológicos e morfométricos da pele em relação à queimadura experimental, induzida em ratos *Wistar*, com diferenças nas respostas fisiológicas de acordo com a aplicação do creme e a utilização ou não de fotobiomodulação. Dessa forma, esta pesquisa tem como objetivo testar essa hipótese e desenvolver um protocolo de tratamento para queimaduras de segundo grau, que são mais dolorosas e exigem intervenções mais precisas. Busca-se, assim, aproximar o estudo da realidade dos pacientes

acometidos por esse tipo de lesão. Para isso, utiliza-se o rato como modelo experimental, por apresentar respostas fisiológicas semelhantes às humanas. Espera-se, com isso, promover uma melhora no processo de reabilitação e fornecer aos profissionais de saúde novos recursos terapêuticos para o tratamento de seus pacientes.

OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar se os efeitos morfofisiológicos da aplicação de creme de sericina com ou sem a associação da fotobiomodulação em modelo experimental de queimadura de 2º grau, em ratos Wistar, contribuem para a resolução dessas lesões, induzidas experimentalmente.

2.2 Objetivos Específicos

1. Comparar os efeitos da pomada padrão e creme de sericina com ou sem a associação da fotobiomodulação nas lesões de queimadura induzidas experimentalmente, quanto à área da lesão, temperatura, análise de perfil inflamatório e estresse oxidativo;
2. Analisar histologicamente os grupos experimentais lesão e controle e avaliar os efeitos dos tratamentos sobre a pele lesionada quanto ao surgimento do tecido de granulação e depósito de colágeno;
3. Analisar o sistema antioxidante dos grupos experimentais lesão e controle e comparar as funções enzimáticas das amostras de pele lesionada e íntegra.
4. Analisar o perfil inflamatório dos grupos experimentais lesão e controle com base nas amostras de pele lesionada coletadas.

3.0. REVISÃO DE LITERATURA

3.1.1. A pele

O tegumento humano é constituído pela pele e anexos cutâneos, como unhas, folículos pilosos, glândulas sudoríparas, glândulas sebáceas, receptores sensoriais e rede vascular. Dessa forma, é considerado o maior órgão do corpo (Boldeanu *et al.*, 2020; Cristina; Santos, 2014). A espessura da pele, varia entre 0,5 e 3,0 mm, de acordo com a região corporal; além disso, apresenta múltiplas funções, a exemplo de barreira protetora contra injúria, patógenos, radiação ultravioleta, auxílio na regulação da temperatura corporal, hidrorregulação, síntese de vitamina D, excreção de íons e recepção sensorial, possuindo notável capacidade de regeneração; ademais, atua como interface dinâmica entre o corpo e o ambiente (Kumar; Abbas; Aster, 2013).

A pele consiste em epitélio estratificado pavimentoso queratinizado em sua parte externa, a epiderme, e camada interna denominada derme. A camada mais profunda de tecido conjuntivo frouxo, hipoderme ou tecido subcutâneo, adere a pele às estruturas subjacentes e permite o movimento sobre o corpo. A pele possui dupla origem embriológica, a saber, a epiderme e seus anexos derivados do ectoderma superficial; a derme origina-se a partir do mesoderma (Guyton; Hall, 2011).

3.1.2. Epiderme

A epiderme consiste principalmente em queratinócitos, os quais perfazem mais de 90% da população celular. Outras células epidérmicas são os melanócitos e as células de Merkel, derivadas da crista neural, e as células de Langerhans, com origem a partir de células da linhagem monocítico-macrofágica na medula óssea (Junqueira; Carneiro, 2013).

Dessa forma, a epiderme é composta por células que sofrem mitoses, diferenciação, maturação e queratinização à medida que vão se deslocando em direção à superfície da epiderme para serem descamadas. É formada por epitélio estratificado pavimentoso que varia de 0,7 a 0,12mm de espessura, sendo que, exceto o estrato basal, as demais camadas, estrato espinhoso,

granuloso, lúcido e córneo, são compostas de células mortas (Kierszenbaum, 2007)

Nesse contexto, o estrato basal, mais profundo, consiste em uma camada única de células epiteliais de formato cuboide a cilíndrico, de citoplasma basófilo, dispostos sobre a lâmina basal. Esse estrato é composto por quatro tipos de células: queratinócitos, melanócitos, células de Merkel e células de Langerhans. Essas sofrem continuamente divisões para substituir as células que se movem em direção à superfície ao longo de toda a espessura da epiderme, com exceção das células de Merkel (Guyton; Hall, 2011).

Portanto, os queratinócitos são células especializadas que produzem a proteína queratina, promovendo o fortalecimento e impermeabilização da pele. Como estão afastados dos nutrientes e do fornecimento de oxigênio da derme, os seus núcleos degeneram-se e os conteúdos celulares são impregnados por queratina. Já os melanócitos, são células especializadas que sintetizam o pigmento melanina, o qual proporciona proteção contra a radiação ultravioleta da luz solar. As células de Merkel, ou células táteis, são escassas quando comparadas aos queratinócitos e melanócitos. Essas são neurônios sensitivos receptores de sensibilidade, os quais auxiliam a recepção tátil. Os dendrócitos granulares não pigmentados, as células de Langerhans, estão dispersos ao longo da membrana basal e são células macrofágicas, protetoras que fagocitam bactérias e outros corpos estranhos (Junqueira; Carneiro, 2013).

A camada seguinte, o estrato espinhoso, possui várias camadas de queratinócitos, que se apresentam em formato poliédrico ou poligonal, os quais vão se tornando progressivamente mais achatados à medida que se deslocam em direção à superfície. Os curtos prolongamentos citoplasmáticos dessas células estão aderidos uns aos outros por desmossomos (Cristina; Santos, 2014; Guyton; Hall, 2011; Junqueira; Carneiro, 2013-).

Subsequentemente, o estrato granuloso é composto por três a quatro camadas de queratinócitos achatados, cujos eixos estão alinhados de forma paralela à superfície da epiderme. Eles contêm numerosos grânulos basófilos, denominados grânulos de querato-hialina, preenchidos com ceratoialina, precursor da queratina (Cristina; Santos, 2014).

Acima do estrato granuloso, há uma delgada camada translúcida e acidófila, o estrato lúcido. Esse estrato ocorre apenas na epiderme da pele espessa, como lábios, palmas das mãos e plantas dos pés, sendo ausente na

epiderme da pele delgada. Consiste em poucas camadas de células pavimentosas densamente agregadas que já não possuem núcleos ou organelas (Graaff, 2013; Ovalle, 2014).

A camada mais externa, o estrato córneo, é composta por até 30 camadas de células já mortas, anucleadas e completamente queratinizadas, de aspecto achatado. Sua espessura varia de acordo com a região corporal. A cornificação, processo produzido pela queratinização, é o ressecamento e achatamento dessa camada, que ocorre como adaptação protetora da pele. Devido à fricção sofrida pela superfície, as células mais superficiais do estrato córneo sofrem uma constante descamação, sendo, portanto, continuamente substituídas (Junqueira; Carneiro, 2013; OVALLE, 2014).

A seguir, evidencia-se imagem ilustrativa com representação da epiderme.

Figura 1 – Representação da estrutura da epiderme.

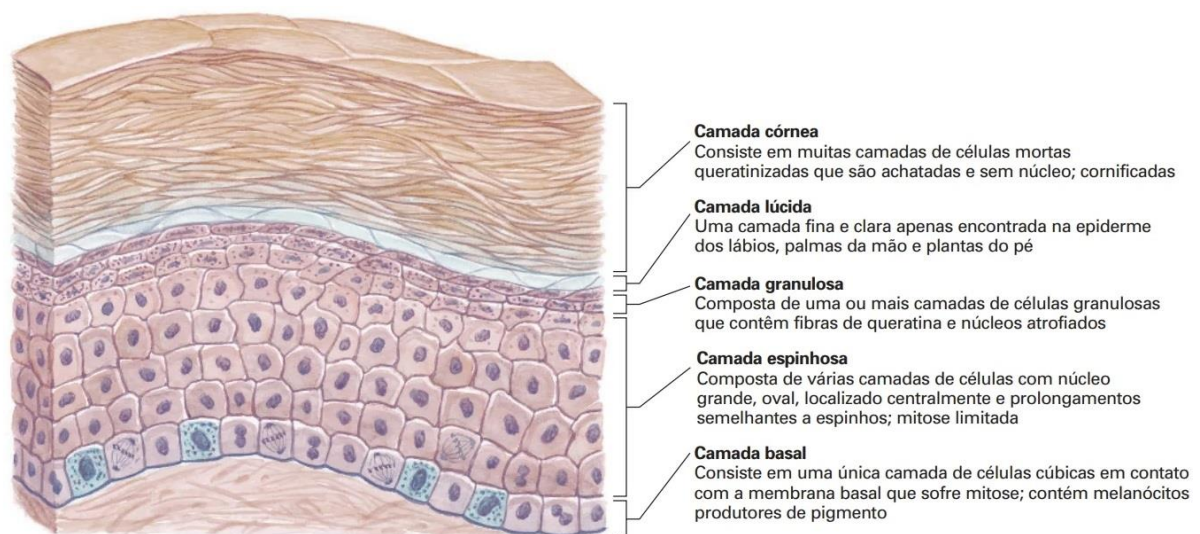


Ilustração didática das camadas que compõe a epiderme. À direita, descrição resumida de cada uma das camadas. Fonte: Graaf (2013).

3.1.3. Derme

A derme, mais profunda e espessa que a epiderme, possui uma extensa rede de vasos sanguíneos, que suprem a nutrição para a porção viva

da epiderme. A derme também possui muitas glândulas sudoríferas, sebáceas, folículos pilosos e uma complexa rede de nervos sensitivos, além de inervação simpática eferente para essas glândulas, musculatura lisa vascular e músculos eretores dos pelos (Junqueira; Carneiro, 2013).

Assim, a derme é constituída por duas camadas, a superior, a camada papilar e a mais profunda, a reticular. A papilar, que está em contato com a epiderme, apresenta diversas projeções, chamadas papilas, que se estendem da parte superior da derme em direção à epiderme. A camada reticular possui fibras que são mais densas e dispostas regularmente para formar uma rede resistente e flexível. Essa camada é bastante distensível, mas, se distendida em demasia, pode levar a rupturas da derme, ocasionando a formação de linhas albicans (Kumar; Abbas; Aster, 2013).

A derme apresenta extensa inervação, composta de efetores tegumentares especializados, que consistem em músculos ou glândulas, os quais respondem aos impulsos motores do sistema nervoso central para a pele através de fibras nervosas autônomas. Diferentes tipos de receptores sensitivos respondem por várias sensibilidades, como tátil, pressão, temperatura, prurido ou nocicepção. A concentração desses receptores apresenta variação de acordo com a região corporal (Junqueira; Carneiro, 2013).

Fascículos nervosos abundantes formam plexos subpapilares, contendo fibras mielínicas e amielínicas. As fibras mielínicas suprem as terminações nervosas da epiderme, associadas às células de Merkel e aos receptores sensoriais encapsulados da derme, como os corpúsculos de Pacini e Meissner. Estes últimos são os mecanorreceptores que medeiam o tato. Já os corpúsculos de Pacini, apresentam-se em regiões mais profundas da derme e tecido subcutâneo, de maneira que são responsáveis pelo sensorial de pressão profunda (Kumar; Abbas; Aster, 2013).

Quanto à vascularização da pele, a derme é um tecido ricamente vascularizado, em que vasos sanguíneos fornecem nutrientes à camada basal mitoticamente ativa da epiderme e às estruturas celulares da derme, como glândulas e folículos pilosos. Os vasos sanguíneos da derme desempenham ainda importante papel na termorregulação do corpo e na pressão arterial sistêmica. Artérias e veias de maior calibre encontram-se no tecido conjuntivo adjacente, a hipoderme, as quais se ramificam e anastomosam para formar

uma rede paralela à superfície da pele. Essas ramificações fornecem nutrientes ao epitélio avascular e circulam folículos pilosos e glândulas. Nas extremidades arteriais, os desvios vasculares são enovelados e circundados por células musculares lisas, que, sob controle vasomotor autônomo, desviam o fluxo sanguíneo superficial e auxiliam a termorregulação corporal (Kumar et al., 2016; Kumar; Abbas; Aster, 2013; Graaff, 2013).

Com relação às glândulas da derme, são exócrinas e consistem em três tipos básicos, a saber, sebáceas, sudoríferas e ceruminosas. As glândulas sebáceas estão associadas aos folículos pilosos, uma vez que se desenvolvem a partir do epitélio folicular do pelo. Dessa forma, são holócrinas que secretam sebo para a haste do pelo. Esse sebo constitui-se principalmente de lipídeos, de maneira que atua na lubrificação e impermeabilização da camada córnea (Kumar; Abbas; Aster, 2013).

As glândulas sudoríferas realizam a excreção do suor sobre a superfície da pele, o qual é composto de água, eletrólitos, ureia e ácido úrico, de maneira que atua no resfriamento pela evaporação e excreção de resíduos. Essas glândulas têm aspecto tubular espiralado e subdividem-se em dois tipos: écrinas e apócrinas (Junqueira; Carneiro, 2013).

As glândulas écrinas são tubulosas e enoveladas, as quais consistem em uma porção secretora e um ducto excretor mais estreito. Possuem inervação colinérgica e atuam essencialmente na termorregulação. As glândulas écrinas ainda auxiliam a excreção de íons e podem produzir 500-750ml ou mais de suor diariamente. Quanto à sua porção secretora, apresenta-se situada profundamente na derme, em dois tipos de células secretoras de formato cuboide a piramidal, que transferem água, eletrólitos e macromoléculas no suor. As células mioepiteliais menores, acidófilas, compartilham a mesma lâmina basal, porém, não atingem o lúmen da porção secretora e são contráteis, auxiliando a secreção do suor para o interior do lúmen da porção secretora. O ducto de contornos espiralados é formado por duas camadas de células epiteliais cúbicas intensamente coradas e possui um diâmetro menor que o da porção secretora e não apresenta células mioepiteliais. Próximo da superfície, o ducto torna-se contínuo com a epiderme, até sua abertura, o poro sudoríparo (Kierszenbaum, 2007; Junqueira; Carneiro, 2013).

Já as glândulas apócrinas, são grandes glândulas tubulosas enoveladas e ramificadas encontradas nas axilas, prepúcio, lábios menores,

mamilos e região perianal. Essas são menos enoveladas que as glândulas écrinas e seu lúmen nos túbulos secretores é revestido por um epitélio simples cúbico; assim, em comparação com as glândulas écrinas, possuem um diâmetro maior e mais amplo, apresentando células mioepiteliais mais numerosas que compartilham a lâmina basal com o epitélio secretor. Também, contam com epitélio estratificado cúbico com duas camadas de células, semelhante ao dos ductos das glândulas écrinas, que reveste os ductos únicos das glândulas apócrinas; tais ductos desembocam nos canais dos folículos pilosos, acima das aberturas dos ductos das glândulas sebáceas, que são glândulas inervadas por fibras nervosas simpáticas adrenérgicas e iniciam sua atividade na puberdade. Já as glândulas ceruminosas, são glândulas apócrinas modificadas na pele do meato auditivo externo, em que secretam o cerúmen, e as glândulas de Moll, associadas às margens livres das pálpebras (Kumar; Abbas; Aster, 2013; Junqueira; Carneiro, 2013)

Com relação às unidades pilosebáceas, presentes na derme, consistem em um folículo piloso e seu pelo, que é um músculo eretor do pelo e uma glândula sebácea. Uma glândula sudorípara apócrina também pode estar associada a um folículo piloso. Com exceção dos lábios, palmas das mãos e plantas dos pés, os pelos recobrem quase a totalidade da superfície corporal (Junqueira; Carneiro, 2013).

Assim, os folículos pilosos desenvolvem-se a partir da epiderme, atravessam a derme e frequentemente se estendem para o interior do tecido conjuntivo subcutâneo, a hipoderme. Portanto, cada pelo consiste em uma haste livre e uma raiz, a qual está envolvida em sua extremidade inferior por um folículo piloso tubular, composto de células epidérmicas envolvidas pelo tecido conjuntivo da derme. Os pelos são hastes queratinizadas que variam de espessura e comprimento. Ademais, são compostos por três camadas epiteliais concêntricas, em que o eixo da haste é formado pela medula, constituída por duas ou três camadas de células cuboides, queratinizadas e retraídas, e as citoqueratinas, das células da medula, que tornam essa camada macia. Periféricamente à medula, encontra-se o córtex, no qual há células queratinizadas achatadas com grânulos de melanina em pelos dotados de cor. A camada mais externa, denominada cutícula, é formada por uma camada de células semelhantes a escamas, as quais são nucleadas na parte inferior da

raiz e da haste, mas que se tornam células escamosas claras e anucleadas após a queratinização (Junqueira; Carneiro, 2013).

Quanto à hipoderme, não é realmente parte da pele, mas realiza a conexão entre a derme e os órgãos subjacentes. A hipoderme é constituída principalmente de tecido conjuntivo frouxo e células adiposas entrelaçadas com vasos sanguíneos. As fibras colágenas e de elastina reforçam a sua estrutura, particularmente nas palmas das mãos e nas plantas dos pés, em que a pele está firmemente aderida às estruturas subjacentes. A quantidade de tecido adiposo na hipoderme varia de acordo com a região corporal, o sexo, a idade e o estado nutricional (Kumar; Abbas; Aster, 2013). Abaixo, apresenta-se a figura ilustrativa das estruturas da epiderme, derme e hipoderme.

Figura 2 – Exemplificação das estruturas da epiderme, derme e hipoderme.

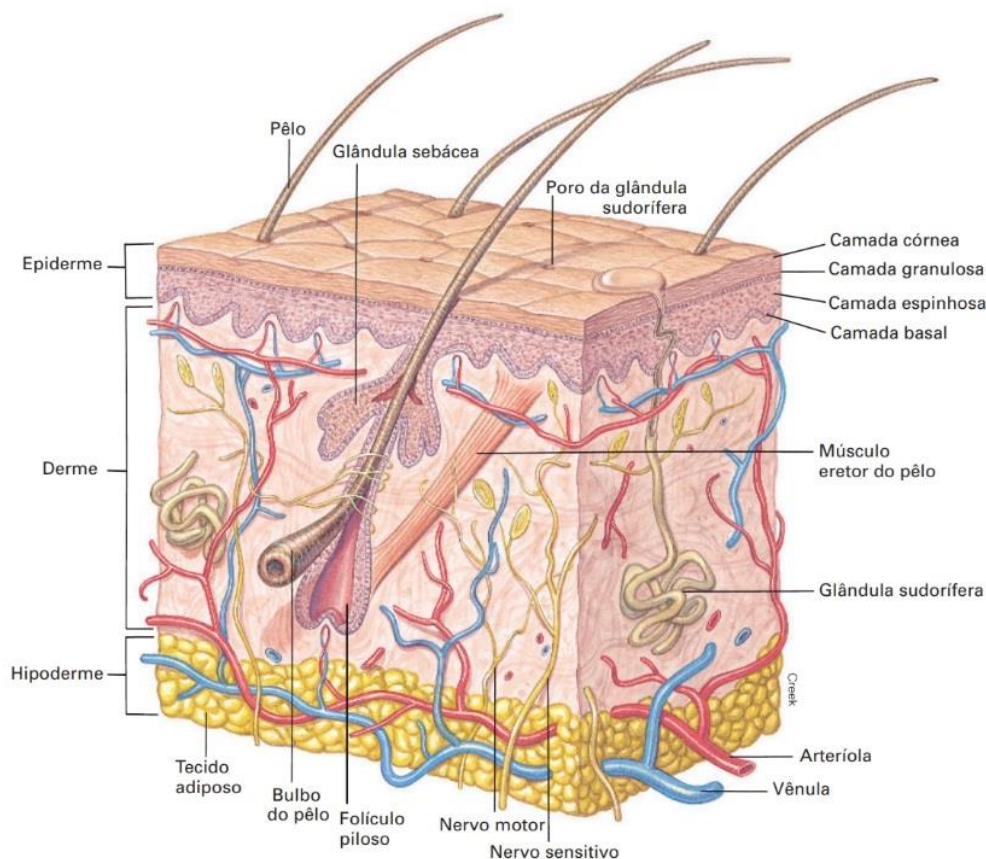


Ilustração das camadas e estruturas que compõe a epiderme, derme e hipoderme. Fonte: Graaf (2013).

3.2. Queimaduras

Queimaduras são um evento traumático complexo, com efeitos locais e sistêmicos, variando em sua causa, de forma que pode ser térmica, química, elétrica, radioativa ou por fricção e acomete aproximadamente 11 milhões de pessoas anualmente em todo o mundo, de acordo com estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS). Isso resulta em aproximadamente 180 mil mortes mundialmente (Evers; Bhavsar; Mailänder, 2010; Jeschke *et al.*, 2020)

A lesão por queimadura é um dos traumas mais debilitantes e ocasiona a destruição dos tecidos acometidos, de acordo com o qual é classificada (Abdullahi; Amini-Nik; Jeschke, 2014b). As queimaduras de primeiro grau ocorrem apenas quando a epiderme é afetada, como as queimaduras solares. Queimaduras de segundo grau são definidas como aquelas em que a epiderme e derme são lesionadas, sendo extremamente dolorosas e sensíveis ao toque, devido à exposição das terminações nervosas presentes na derme. Essas são subdivididas em superficiais, quando há umidade devido ao extravasamento de plasma, e profundas, menos dolorosas e mais susceptíveis a infecções. As de terceiro grau comprometem toda a extensão da derme, são pouco dolorosas, em consequência da destruição das terminações nervosas, e necessitam de abordagem cirúrgica para sua resolução. As queimaduras de quarto grau são as mais profundas, atingindo tecidos como músculos e ossos e frequentemente resultam na perda do segmento corporal afetado (Jeschke *et al.*, 2020; Oryan; Alemzadeh; Moshiri, 2017).

A seguir, imagem representativa dos diferentes tipos de queimaduras de acordo com a sua profundidade:

Figura 3 – Imagem representando os tipos de queimadura de acordo com a sua profundidade.

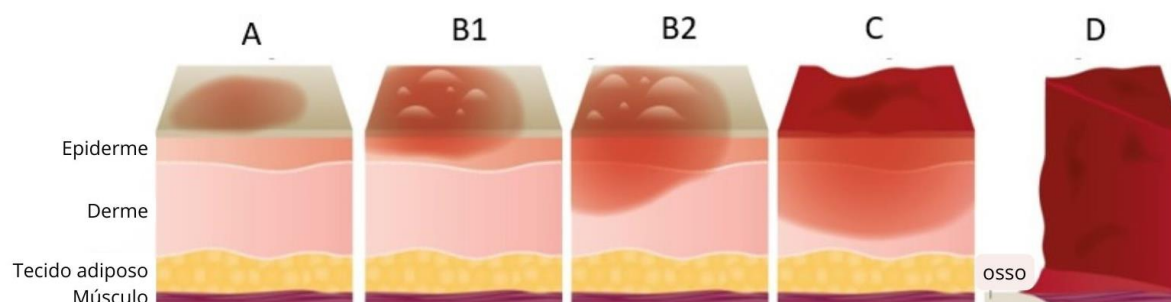


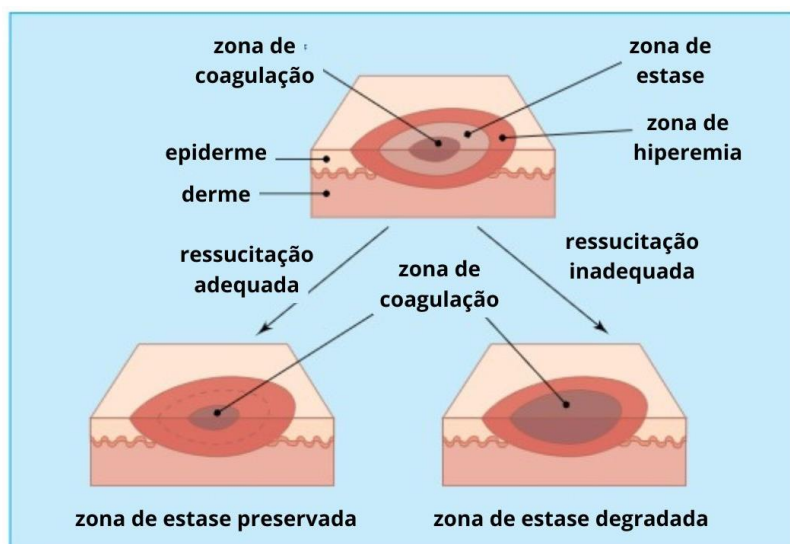
Ilustração das queimaduras. Da esquerda para a direita: Primeiro grau (A), mais superficial, doloridas, que não deixam cicatrizes. Segundo grau, de comprometimento parcial (B1) ou profundidade intermediária (B2), podem apresentar bolhas e produção de exsudato; quanto

mais profundas menos dolorosas, porém, com maior probabilidade de formação de cicatrizes. Terceiro grau (C), mais ressecadas, insensíveis ao toque, pequenas áreas podem ser recuperadas, porém, com formação de cicatrizes; apresentam alto risco de infecção e necessitam de intervenção cirúrgica. Quarto grau (D) ocasiona o comprometimento de tecido muscular e ósseo, resultando na perda do seguimento corporal afetado. Fonte: adaptado de Jeschke et al. (2020).

As queimaduras de segundo grau tendem a evoluir em profundidade nas horas subsequentes ao trauma inicial. Essa progressão pode ocasionar lesões de terceiro grau e, posteriormente, de quarto grau, geralmente entre 48 horas e quatro dias após a ocorrência, atingindo o pico em aproximadamente 72 horas. Essa evolução é atribuída à zona de coagulação da lesão, considerada a principal responsável pelo agravamento tecidual (Evers; Bhavsar; Mailänder, 2010).

Ademais, a lesão por queimadura ainda é dividida em três zonas, conforme o proposto por Jackson (Hettiaratchy; Dziewulski, 2004). A zona de coagulação efetiva-se como a região mais afetada e mais central, com danos irreversíveis e destruição tecidual pela coagulação dos seus constituintes proteicos. A zona de estase ou isquemia é caracterizada pela hipoperfusão local, porém, demonstra-se como principal foco dos tratamentos locais, pois ainda é viável de ressuscitação com o tratamento adequado, de maneira que pode resultar em perda tecidual em até 48 horas após o trauma, caso o manejo da lesão seja inadequado; isso pode acarretar expansão da área lesionada. Por fim, há a zona de hiperemia, mais periférica e caracterizada pela vasodilatação dos tecidos, que eventualmente evolui com resolução, conforme ilustra figura a seguir (Evers; Bhavsar; Mailänder, 2010; Hettiaratchy; Dziewulski, 2004; Jeschke et al., 2020; Khosroshahi et al., 2019; Nielson et al., 2017).

Figura
do



4 – Ilustração
modelo de
Jackson.

Ilustração das zonas de área queimada segundo o modelo proposto por Jackson. No topo da imagem, há a formação das três zonas; do centro em direção à borda, está a zona de coagulação, de estase e de hiperemia. Abaixo, à direita, evidencia-se a evolução da lesão com preservação da zona de estase e revitalização tecidual. Abaixo, à esquerda, apresenta-se a evolução da lesão com perda da zona de estase e perda tecidual com agravamento. Fonte: Hettiaratchy et al. (2019).

3.2.1. Fisiopatologia das queimaduras

O processo de resolução de uma queimadura envolve fases dinâmicas e sobrepostas, que são a fase de hemostasia, inflamação, proliferativa e remodelamento. Imediatamente após o trauma, a hemostasia é iniciada por meio da vasoconstrição local, ativação e agregação plaquetária, bem como da liberação de fatores, a exemplo do fator de crescimento derivado de plaquetas (*platelet- derived growth factor* – PDGF), fator de crescimento epidérmico (*epidermal growth factor* – EGF) e fator de crescimento transformante (*transforming growth factor- β* – TGF β), pela plaquetas, queratinócitos, macrófagos e fibroblastos, que irá resultar em um coágulo e produzirá a próxima fase, a inflamatória (Jeschke *et al.*, 2020).

A fase inflamatória ocorre naturalmente para a degradação do tecido necrótico e início da cascata de sinais necessários para a reparação da lesão. Células, como monócitos, macrófagos e neutrófilos, são recrutadas, sendo que neutrófilos e macrófagos liberam citocinas e quimiocinas, consistindo em IL-1 β , IL-8 e TNF α , responsável pela liberação de IL-6, e fatores de crescimento, como TGF β , essencial para o recrutamento de fibroblastos, que secretam IGF (*insulin- like growth factor*) e VEGF (*vascular-endotelial growth factor*) (Evers; Bhavsar; Mailänder, 2010; Jeschke *et al.*, 2020; Khosroshahi *et al.*, 2019).

A isquemia inicial provocada pela vasoconstrição, durante a fase de hemostasia, seguida pela reperfusão característica da fase inflamatória, constitui um dos principais fatores responsáveis pelo estresse oxidativo local. Esse processo é marcado pelo desequilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio (EROs) e os mecanismos de defesa antioxidante.

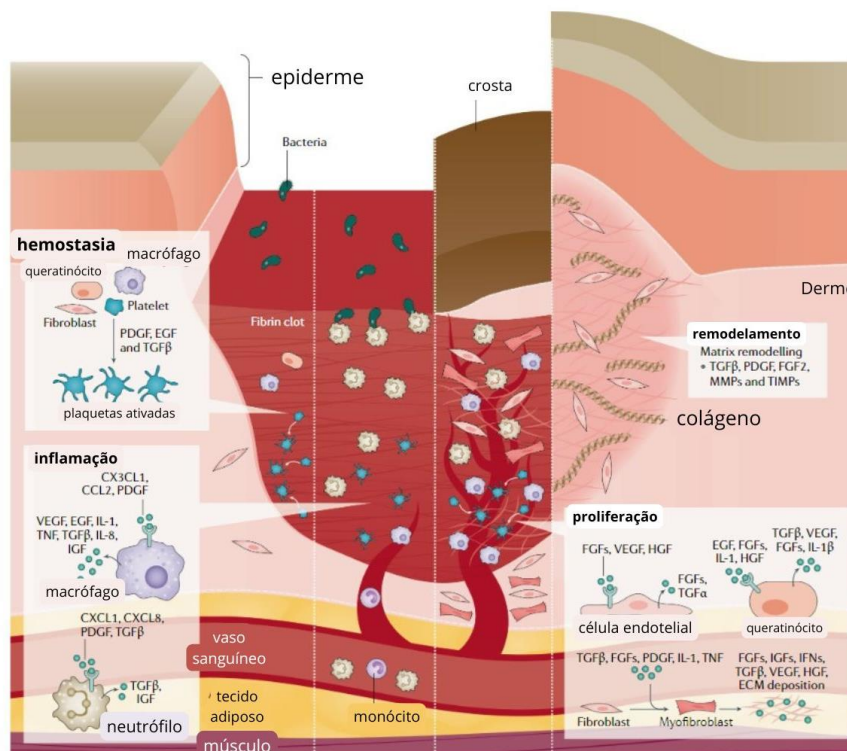
A atividade celular pró-inflamatória, principalmente dos neutrófilos, e a liberação das citocinas, também, contribuem para a formação de EROs e ERNs, que eventualmente ocasionam a lipoperoxidação, a qual, por sua vez, contribui para maior degeneração tecidual no local da lesão, devido ao aumento da concentração de malonaldeídos (MDA), uma vez que as membranas celulares são ricas em ácidos graxos poli-insaturados, um alvo vulnerável às EROs (Jeschke *et al.*, 2020; Parihar *et al.*, 2008).

Durante a fase seguinte, de proliferação, há o recrutamento e ativação de fibroblastos e queratinócitos para o sítio da lesão. Essa fase é caracterizada pela substituição da matriz provisória por tecido de granulação e a formação de uma matriz celular definitiva, angiogênese e epitelização. Os queratinócitos auxiliam tanto na angiogênese quanto epitelização, vitais para a resolução da lesão. As células endoteliais são ativadas pelos fatores VEGF, fator de crescimento de hepatócitos (*hepatocyte growth factor* - HGF) e fator de crescimento fibroblástico (*fibroblast growth factors* - FGF). Os fibroblastos são transformados em miofibroblastos e são envolvidos na matriz extracelular. Os fibroblastos são ativados por TGF β , entretanto, quando a atividade desse fator é sustentada de modo prolongado, há a ocorrência de cicatrizes hipertróficas e a formação de queloides, caracterizados pelo mal posicionamento das fibras de colágeno (Evers; Bhavsar; Mailänder, 2010; Jeschke *et al.*, 2020).

Sobrepondo-se à fase de proliferação, tem início a fase de remodelamento, caracterizada pelo amadurecimento do tecido de granulação e pela formação da cicatriz. Nesse estágio, ocorre a deposição e reorganização de colágeno e elastina, enquanto a matriz extracelular, produzida pelos miofibroblastos, é remodelada sob a influência dos inibidores de metaloproteases (TIMP). Como resultado, há um aumento progressivo da resistência à tração do tecido (Jeschke *et al.*, 2020; Rowan *et al.*, 2015a).

A figura abaixo ilustra as quatro fases da resolução da lesão por queimadura.

Figura 5 – Figura das quatro fases de desenvolvimento de uma lesão por queimadura.



Representação das quatro fases de evolução de uma lesão por queimadura de segundo grau. Da esquerda para a direita: fase de hemostasia, iniciando imediatamente após o trauma, com vasoconstrição, ativação e agregação plaquetária, além de liberação de PDGF, EGF e TGFβ por queratinócitos, macrófagos e fibroblastos. Fase inflamatória, com recrutamento de neutrófilos e macrófagos, e a liberação de IL1, IL8 e TNF, TGFβ, IGF e VEGF; então, por fim, remoção de detritos e patógenos. Fase proliferativa, de recrutamento e ativação de fibroblastos e queratinócitos, formação do tecido de granulação, angiogênese e epitelização. Células endoteliais são ativadas por VEGF, HGF e FGF e fibroblastos são transformados em miofibroblastos, sendo depositados na nova matriz extracelular. Fase de remodelamento, quando o tecido de granulação sofre maturação e é remodelado pela influência de MMP e TIMP, o que ocasiona o fortalecimento do tecido pelas fibras colágenas. Fonte: Jeschke et al. (2020).

O tempo para a resolução da lesão depende de múltiplos fatores, como gravidade inicial, extensão da lesão, ativação adequada de cascata inflamatória e estado nutricional. Com relação à extensão da lesão, o cálculo de área de superfície corporal total é realizado com a Regra dos Nove, em que cada segmento corporal equivale a um múltiplo de nove, para crianças e adultos, seguindo diferentes proporções de acordo com a idade. Esse cálculo é fundamental para a escolha do tratamento mais adequado, principalmente, a respeito da terapia intravenosa e ressuscitação hídrica, indicada quando a área

corporal queimada é superior a 20% (Jeschke *et al.*, 2020; Khosroshahi *et al.*, 2019). A imagem, a seguir, ilustra a realização desse cálculo. Para ratos, animal de experimentação objeto deste estudo, o cálculo é realizado considerando a seguinte fórmula:

$$SC = K * P^{2/3}$$

Assim, SC é a superfície corporal, K é a constante de Meeh (10,65) e P é a massa em gramas do animal (De Campos *et al.*, 2015).

A escolha do tratamento mais adequado para as queimaduras é baseada em múltiplas variáveis, como profundidade, extensão, localização da lesão, idade do paciente, associação ou não de outros traumas e comorbidades (Nímia *et al.*, 2018).

A sulfadiazina de prata tem sido amplamente utilizada desde 1970 e ainda é uma das principais escolhas como tratamento das queimaduras (Nímia *et al.*, 2018; Rowan *et al.*, 2015b). Considerando, ademais, a necessidade de terapias para manter baixos os níveis de produção de radicais livres e melhorar as defesas antioxidantes, entre as abordagens atuais, o uso do laser de baixa potência tem demonstrado bons resultados como uma terapia provedora de reparação tecidual (Silveira *et al.*, 2016).

3.2.2. Sulfadiazina de prata como tratamento tópico das queimaduras

Considerando que a pele desempenha funções essenciais, como barreira protetora, regulação térmica e hidrorregulação (Ovalle, 2014), sua destruição compromete significativamente esses mecanismos. Dessa forma, para preservar a homeostasia, manter a termorregulação e proteger o sítio da lesão contra infecções, torna-se necessária a oclusão da área queimada por meio de curativos adequados (Khosroshahi *et al.*, 2019; Nímia *et al.*, 2018).

Na confecção de curativos, agentes tópicos com propriedades antimicrobianas são amplamente utilizados, os quais devem ser aplicados diretamente sobre o leito da lesão, em uma camada única, que cubra a lesão; após isso, a área machucada deve ser coberta por compressas de gaze, para evitar a evaporação e perda da umidade (Nettina, 2021). Entre os agentes tópicos que podem ser utilizados, a sulfadiazina de prata é frequentemente escolhida, devido às suas características de fácil aplicação, baixo custo, ser

indolor e eficaz antimicrobiano de amplo espectro (Thorne; Grabb; Smith, 2008; Khosroshahi et al., 2019; Nímia et al., 2018).

O mecanismo de ação da prata ocorre pela sua atividade iônica, citotóxica a agentes infecciosos, como bactéria, vírus e fungos, pela sua reação com o DNA e/ou RNA desses patógenos, o que ocasiona a morte celular (Khansa, 2019). Produtos utilizados na confecção de curativos com prata em sua composição exigem trocas menos frequentes desses curativos, menor manipulação e traumatização do leito da lesão, além de menos tempo de exposição da queimadura (Pellico, 2014)

Entretanto, a sulfadiazina possui penetração mínima sobre a escara formada pelo coágulo no sítio da lesão e intermediária sobre a pele, assim, não há evidências diretas da prevenção de infecção nas lesões tratadas com esse medicamento e há o relato da ocorrência de atraso no processo de resolução dessas lesões (Hussain; Ferguson, 2006; Thorne; Grabb; Smith, 2008; Nímia et al., 2018).

Pesquisas relatam que a prata pode retardar o crescimento celular dos queratinócitos e fibroblastos, pois, como metal, é relativamente inerte, mas, uma vez ionizada por fluídos, torna-se altamente reativa, ligando-se a proteínas de membrana, o que ocasiona desnaturação proteica e disfunção mitocondrial. Ademais, inibe os fatores de crescimento que fazem a ativação dos fibroblastos e queratinócitos (Kempf; Kimble; Cuttle, 2011; Nímia et al., 2018; Rowan et al., 2015b).

Portanto, é necessário o desenvolvimento de novos tratamentos, para melhorar o resultado dos processos de reparação tecidual e desfecho na resolução das lesões por queimadura (Jeschke et al., 2020; Rowan et al., 2015).

Um estudo clínico, realizado por Aramwit et al. (2013), utilizando um composto de sulfadiazina de prata em conjunto com a sericina, foi eficaz para prevenir infecções no leito da lesão e levou a um processo de reepitelização acelerado em relação ao grupo controle, tratado apenas com sulfadiazina. Enquanto isso, outras pesquisas demonstram que a sericina é eficiente na promoção da migração de fibroblastos, indução na produção de colágeno, sem ocasionar a ativação de citocinas pró-inflamatórias (Aramwit et al., 2009, 2010; Padamwar et al., 2005).

3.3. Sericina

Sericina é a proteína produzida em conjunto com a fibroína pela lagarta do bicho-da-seda, o *Bombyx mori* (*B. mori*), inseto pertencente à ordem Lepidoptera e família Bombycidae, para a formação da trama do fio de seda utilizado na construção de seu casulo. A *B. mori* é a principal espécie utilizada na indústria agrotêxtil e para pesquisas científicas, devido ao potencial uso de seus produtos para a fabricação de biomateriais, polímeros, cosméticos e indústria alimentícia (Kunz *et al.*, 2016).

Na indústria têxtil, o casulo é processado, de modo que a fibroína e a sericina são separadas por degomização. A fibroína é utilizada na fiação de seda e a sericina é descartada como resíduo da água utilizada. O aproveitamento da sericina poderia ter impacto econômico e ambiental, principalmente em países em que a sericultura é mais desenvolvida, como o Brasil, China e Índia (Kunz *et al.*, 2016).

A sericina compõe de 20 a 30% do casulo e pode ser extraída por meio de vários métodos de degomização, processo de separação das fibras de fibroína e sericina, por tratamentos químicos, alcalinos ou ácidos, métodos enzimáticos, utilizando proteases, bem como por fervura, através de autoclavagem ou infravermelho (Kunz *et al.*, 2016; Lamboni *et al.*, 2015). Portanto, os diferentes métodos de extração vão resultar em proteínas com diferentes pesos moleculares, que entregarão diferentes propriedades químicas e biológicas (Aramwit *et al.*, 2010).

Quando obtida por autoclavagem, a sericina apresenta alto peso molecular, que varia de 25 a 150 kDa, composta de 90% de proteína e 10% de outras moléculas, como pigmentos, açúcares e sais minerais. É composta por 17 aminoácidos, sendo 78% polares (serina e asparagina) e 22% não polares (Aramwit *et al.*, 2010; Bari *et al.*, 2018). Em um estudo de Aramwit *et al.* (2010), comparando a sericina advinda de diferentes processos de degomização e diferentes pesos moleculares na proliferação de fibroblastos e produção de colágeno *in vitro*, apontou-se que a sericina proveniente da autoclavagem apresentou menor toxicidade aos fibroblastos e induziu maior produção de colágeno do tipo I, em relação às demais variações de sericina.

A sericina, dessa forma, apresenta propriedades hidratantes, pela reparação de fatores naturais e prevenção da perda de água transepidérmica,

além de aumento do conteúdo de hidroxiprolina no estrato córneo, o que diminui a impedância da pele (Aramwit *et al.*, 2013). Outra característica da sericina é seu potencial antioxidante, pois os extratos etanoicos de sua composição apresentaram ação antioxidante duas vezes superior à vitamina E, devido à sua sequência de aminoácidos, que permite a eliminação de EROs, aumenta a atividade de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase e a glutathione peroxidase, e faz a inibição da tirosinase (Bari *et al.*, 2018).

A sericina também se apresenta como potente agente antiapoptótico, segundo Dash *et al.* (2008), visto que foi eficaz em inibir apoptose celular em queratinócitos expostos à radiação UVB e inibiu a formação de peróxido de hidrogênio, prevenindo dano mitocondrial (Bari *et al.*, 2018; Dash *et al.*, 2008).

Estudos também apontam a utilização benéfica da sericina para a resolução de lesões de pele. Animais de experimento que receberam tratamento com um creme a base de sericina apresentaram melhores características de cicatrização do que o controle, tratados sem a proteína (Aramwit *et al.*, 2009). Em outra pesquisa, utilizando hidrogel composto de sericina a 1%, os animais analisados apresentaram melhora da espessura da epiderme, vascularização, crescimento do pelo, degeneração de edema e diminuição de área necrótica (Ersel *et al.*, 2016). A sericina também foi utilizada para o tratamento de lesões por queimadura, reduzindo a formação de cicatriz e prevenindo infecções (Bari *et al.*, 2018). Outra pesquisa, um ensaio clínico com 29 pacientes, com queimaduras de segundo grau, os quais foram tratados com um creme que combinava sulfadiazina de prata com sericina a 8%, demonstrou que os pacientes tratados com o composto de sericina evoluíram com completa resolução da lesão até 5 dias antes dos pacientes controle, tratados apenas com sulfadiazina, considerando o tempo total de experimento, que foi de 21 dias (Aramwit *et al.*, 2013).

3.4. Fotobiomodulação - laser de baixa potência

O uso da luz como método terapêutico tornou-se mais popular durante o século XIX, quando o cientista dinamarquês, Niels Ryberg Finsen, demonstrou os benefícios das luzes vermelha e azul no tratamento de lúpus, o que lhe rendeu um prêmio Nobel de medicina e fisiologia em 1903. Em 1960, foi inventado o LASER (*light amplification by stimulated emission of radiation*),

por Theodore Maiman, e, na mesma década, o médico Endre Mester relatou que a terapia de fotoestimulação foi eficaz na promoção da resolução de lesões e crescimento de pelos em ratos (Mosca *et al.*, 2019).

Nesse contexto, é preciso ressaltar que a luz é a forma física da energia e as interações dos tecidos biológicos com a luz são categorizadas em quatro processos, os quais são absorção, reflexão, espalhamento e transmissão. Com relação aos benefícios terapêuticos, são divididas em produtivas (absorção e espalhamento) e não produtivas (reflexão e transmissão). Essas interações são determinadas pelas propriedades da luz, de comprimento de onda, pulsação, energia total e duração, bem como pela composição e a condição dos tecidos em que é aplicada (Mosca *et al.*, 2019; Núñez *et al.*, 2013).

Das interações produtivas, o espalhamento é o resultado da heterogeneidade dos tecidos, ocorrendo quando os fótons mudam a sua direção de propagação; isso diminui sua penetração, limitando a profundidade dos tratamentos, de forma que é o colágeno o principal responsável por esse fenômeno. A absorção é a efetividade de penetração da luz nos tecidos, estando relacionada com três fatores: melanina, hemoglobina e água. Assim, os comprimentos de onda vermelhos estão entre 620 e 750nm, de maneira que são menos absorvidos pela melanina e a hemoglobina (Mosca *et al.*, 2019).

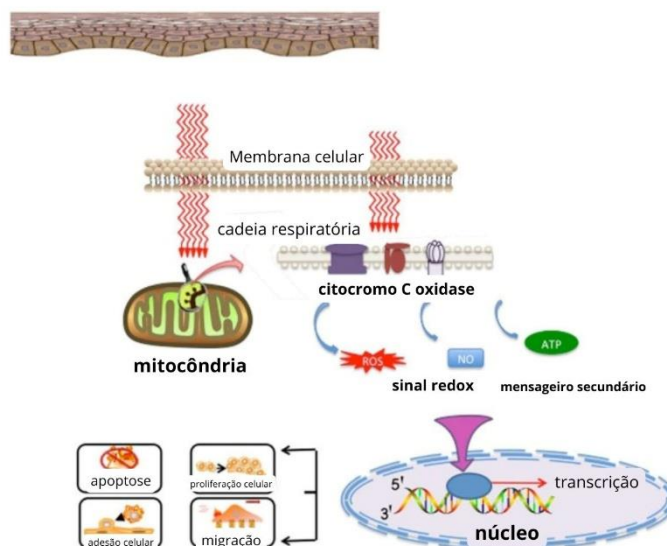
Os mecanismos associados à fotobioestimulação celular pelas terapias com laser ainda não estão completamente esclarecidos, mas os indícios apontam que o laser tem amplo efeito molecular, celular e tecidual (Avci *et al.*, 2013; Silveira *et al.*, 2016). As respostas biológicas do organismo são o resultado direto da transferência de energia física da radiação, que ocasiona uma mudança bioquímica ou biofísica nos tecidos, à medida que a energia se atenua progressivamente até a sua extinção (Mosca *et al.*, 2019).

Portanto, é por meio da absorção da luz vermelha ou NIR pelos cromóforos mitocondriais, especialmente o citocromo c-oxidase (CCO), contido na cadeia respiratória, que o laser exerce seus benefícios terapêuticos. Assim, ocorre uma cascata de eventos na mitocôndria, o que ocasiona a bioestimulação por vários processos. Ao estimular o complexo proteico CCO, propicia-se o aumento da atividade enzimática, transporte de elétrons, respiração mitocondrial e produção de adenosina trifosfato (ATP). A irradiação, em determinados comprimentos de onda, demonstrou ainda efeitos inibitórios

sobre os marcadores inflamatórios prostaglandina-2, $\text{TNF}\alpha$ e $\text{IL1}\beta$, estimulação da produção de colágeno, ativação dos fibroblastos e sobre a expressão de metaloproteinases. Assim, o LBP altera, aumentando o estado de redox celular, que induz à ativação sinais intracelulares, alterando fatores de transcrição promovedores de proliferação celular e reparação tecidual (Avci *et al.*, 2013; Lamaro-Cardoso *et al.*, 2019). A figura a seguir, ilustra estes processos.

Figura 7 – Figura representando o mecanismo de ação do LBP.

Ilustração do mecanismo de ação do LBP. Sua ação ocorre pela absorção da luz vermelha pelos cromóforos mitocondriais, especialmente o CCO, parte da cadeia respiratória mitocondrial, como visto na parte superior da imagem. A absorção da energia luminosa causa fotodissociação do óxido nítrico inibitório de CCO, que ocasiona a melhora da atividade enzimática, transporte de elétrons, respiração e produção de ATP, aumentando o redox celular,



à direita da imagem. Assim, altera a afinidade de fatores de transcrição que atuam na proliferação celular e regeneração tecidual. Fonte: Avci *et al.* (2013).

Considerando que as queimaduras ocasionam a destruição tecidual e que o laser induz o aceleração do processo de resolução da lesão por meio de seus efeitos de bioestimulação, alguns estudos realizaram experimentos com animais (Fiório *et al.*, 2014; Khan *et al.*, 2021; Lamaro-Cardoso *et al.*, 2019; Núñez *et al.*, 2013; Silveira *et al.*, 2016), relacionando o tratamento com laser, com diferentes parâmetros e protocolos, em queimaduras de terceiro grau. Além disso, Ocon *et al.* (2019), em revisão sistemática sobre fotobiomodulação como tratamento para queimaduras de terceiro grau, apontaram que o LBP foi eficaz a curto prazo no aceleração das lesões, modulando processos inflamatórios, o que eleva o depósito de colágeno tipo I e III e influencia uma menor regulação da matriz de metaloproteinases.

METODOLOGIA

A pesquisa classifica-se como descritiva de caráter experimental, com análise de cunho quantitativo (GIL, 2007) e foi realizada no Laboratório de Estudo das Lesões e Recursos Fisioterapêuticos (LELRF) e no Laboratório de Biologia Estrutural e Funcional (LABEF) vinculados à Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE) – Campus de Cascavel. O projeto foi encaminhado e aprovado pelo Comitê de Ética em Uso Animal da UNIOESTE, pelo parecer número: 16-21.

4.1- ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS

O grupo amostral foi composto por 120 ratos, machos, da linhagem *Wistar*, com peso aproximado de 350g, obtidos no Biotério Central da UNIOESTE e, posteriormente, alojados no LELRF, que eram mantidos em caixas plásticas padrão de polipropileno, com quatro animais por caixa, com acesso à água e ração *ad libitum*, temperatura controlada a $21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo claro/escuro de 12 horas. Os animais foram separados em grupos diferentes de forma aleatória, manualmente, por um experimentador, antes do início do experimento. Esses animais permaneciam por sete dias em aclimação no biotério antes do início das análises basais.

O período experimental total estendeu-se por pouco mais de seis meses, assim, para evitar possíveis vieses, os grupos foram divididos e apenas 4 animais, no máximo, daquele grupo, eram submetidos aos procedimentos e avaliações, sendo que sempre havia animais de todos os grupos participando do experimento. Para isso, eram advindos do biotério por levadas de aproximadamente 20 animais por vez, dentro do peso aproximado citado acima.

O estudo não foi cego, dessa forma, os animais eram identificados individualmente para que fosse possível o rastreamento de cada amostra. A todo tempo, os experimentadores sabiam com qual grupo estavam trabalhando, a origem, data de nascimento, peso, data de fornecimento pelo biotério e identificação individual do animal; ademais, sabiam sua respectiva intervenção experimental.

Para a padronização da lesão, principalmente quanto à profundidade da queimadura, fez-se necessária a realização de um estudo piloto.

4.1.1- Delineamento do grupo piloto

A indução da lesão por queimadura foi realizada no dorso do animal após a confirmação da sedação, verificada pela ausência dos reflexos palpebrais e resposta ao pinçamento das pregas digitais. Em seguida, realizou-se a antissepsia da pele previamente tricotomizada com álcool 70%. Utilizou-se, então, uma placa metálica de 1,0 × 1,0 cm, fixada a uma peça de madeira e com peso total de 60 g, conforme instrumento adaptado de Meyer (1999).

A região do instrumento utilizado para causar a queimadura foi aquecida com auxílio de um bico de bunsen, de maneira que a placa metálica ficou em contato com a chama por 30 segundos (Santos *et al.*, 2019). Após o aquecimento do instrumento, imediatamente, era colocado sobre o dorso do animal sendo utilizado apenas o peso do instrumento de 60 g, sem nenhuma pressão, para que não houvesse alteração de profundidade da lesão.

Na padronização de profundidade da lesão, os 30 animais do grupo piloto foram divididos em três grupos, sendo 10 animais para cada grupo com tempos diferentes de contato com o instrumento aquecido, a fim de padronizar o tempo de contato ideal para uma queimadura de segundo grau.

Os animais foram separados aleatoriamente em 3 grupos:

G1 – Grupo queimadura 3 segundos – n = 10.

G2 – Grupo queimadura 6 segundos – n = 10.

G3 - Grupo queimadura 9 segundos – n = 10.

Imediatamente após a realização do procedimento no primeiro grupo, verificou-se que a lesão formada já demonstrava aspecto de queimadura de segundo grau, apresentando hiperemia e leve escurecimento no local (Jeschke *et al.*, 2020). Dessa forma, os demais animais não foram anestesiados e não foram submetidos ao procedimento, sendo, então, remanejados para outro experimento.

Após 5 dias da lesão, os animais foram eutanasiados, por meio de sobredosagem da associação de anestésico dissociativo (Cetamina - 240 mg/Kg) e de agonista de adrenorreceptores alfa 2 (Xilazina - 45 mg/Kg) administrados pela via intraperitoneal.

Após eutanásia dos animais, realizou-se a coleta de amostras de pele lesionada e íntegra para processamento histológico e, então, diagnóstico da profundidade da lesão. O fragmento coletado foi lavado com álcool 70% e fixado em 10% de formalina. As peças foram, em seguida, desidratadas em uma série crescente de álcoois (70%, 80%, 90%, 100% I, 100%II e 100%III), diafanizadas através do álcool xilol I, II e III e emblocadas em parafina histológica.

Posteriormente, foi realizada a microtomia obtendo-se cortes sagitais de 5 µm em micrótomo *Olympus* (R CUT 4055 Tóquio, Japão) para obtenção de lâminas histológicas do tecido. As lâminas foram coradas em hematoxilina e eosina (HE). Essas amostras foram analisadas em microscopia de luz, em objetiva de 40x, de forma que foi possível observar a destruição da epiderme no local e exposição da derme, a qual ficou comprometida em sua porção mais superficial, a camada papilar, caracterizando-se, assim, como queimadura de segundo grau (Jeschke et al., 2020; Vasheghani et al., 2008).

4.1.2- Delineamento experimental

Os 120 animais machos, com peso aproximado de 350g, foram divididos aleatoriamente, manualmente por um experimentador, antes do início do experimento, em 6 grupos:

G1 - Grupo lesão controle – animais submetidos à lesão sem nenhum tipo de tratamento - n= 20.

G2 - Grupo lesão sulfadiazina – Animais submetidos à lesão por queimadura e tratados com pomada de sulfadiazina de prata – n=20.

G3 - Grupo lesão Sericina – Animais submetidos à lesão por queimadura e tratados com creme de sericina - n= 20.

G4 – Grupo lesão laser – Animais submetidos à lesão e tratados apenas com laser – n= 20.

G5 – Grupo lesão pomada padrão LBP – Animais submetidos à lesão e tratados com pomada padrão de sulfadiazina de prata e laser – n=20.

G6 – Grupo lesão Sericina laser – Animais submetidos à lesão e tratados com creme de sericina e laser – n=20.

Esses grupos foram subdivididos em dois tempos diferentes de eutanásia, sendo que metade de cada grupo foi eutanasiada com sete dias e a outra metade, com 14 dias, após a indução da queimadura, para avaliação de diferentes fases de resolução da lesão, conforme exemplifica a imagem a seguir:

Figura 8 – Figura representando a distribuição dos animais nos grupos experimentais.

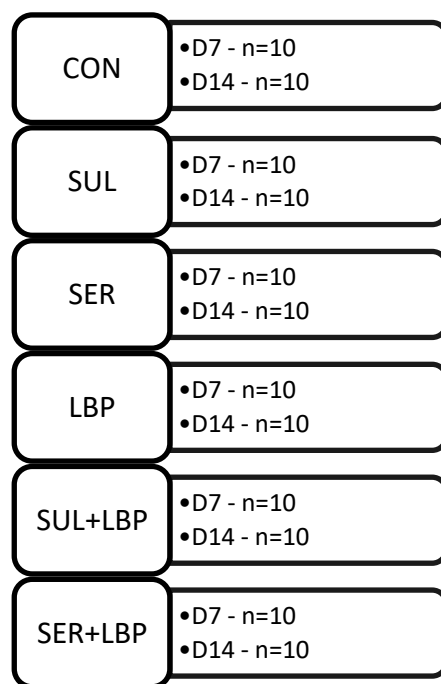


Ilustração da distribuição dos grupos, totalizando 10 animais por grupo.

4.2. MODELO EXPERIMENTAL DE QUEIMADURA DE 2º GRAU

A queimadura foi induzida com base nos protocolos estabelecidos por Chiarotto et al. (2014), Cai et al. (2014) e Santos et al. (2019), com adaptações e seguindo o que foi realizado no estudo piloto. Assim, os animais foram anestesiados com 50mg/Kg de xilazina e 75mg/Kg de cloridato de quetamina,

por injeção intraperitoneal. A seguir, os animais foram tricotomizados em região interescapular e a área submetida à assepsia com álcool 70%. O instrumento para realização da queimadura foi aquecido em bico de bunsen, por 30 segundos e permaneceu em contato com a pele do animal, na região tricotomizada, por 3 segundos para a formação da queimadura de 2º grau, previamente estabelecido pelo estudo do grupo piloto, com destruição total da epiderme e parcial da derme.

Após o procedimento, depois de despertados, os animais foram medicados para dor com dipirona via oral na dose de 50mg/Kg, segundo recomendação do veterinário do biotério, sempre que os animais apresentassem sinais de dor (MANUAL DE ANESTESIA E ANALGESIA DO BIOTÉRIO DA UNIFAL-MG 1-ANESTESIA EM ANIMAIS DE LABORATÓRIO, [s. d.]; Seabra *et al.*, [s. d.]

Figura 9 – Linha do tempo do experimento.

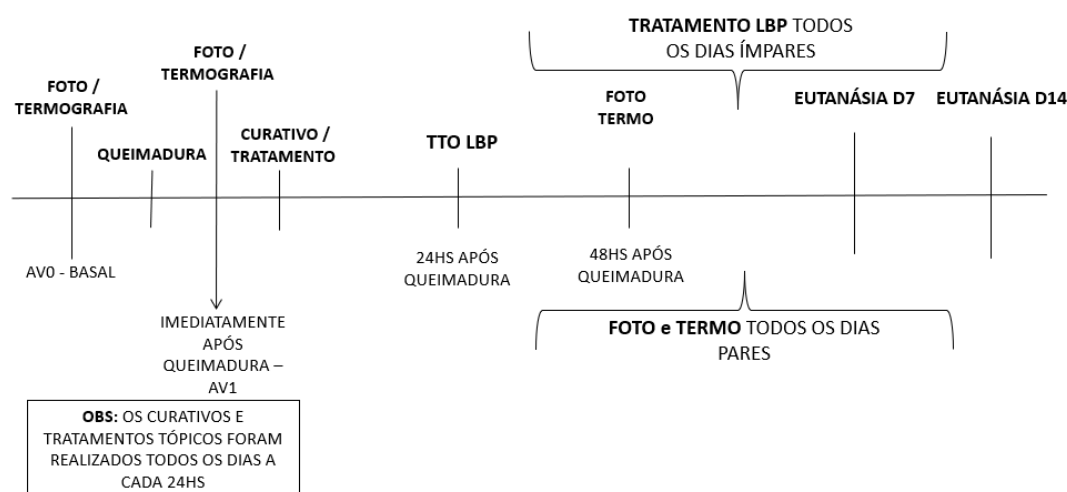


Imagem ilustrativa da linha do tempo de realização do experimento. À esquerda, no início do ciclo de experimento, as primeiras avaliações (AV0) são realizadas antes da indução da queimadura. A partir disso, as avaliações seguem conforme esquema, enquanto os curativos são trocados diariamente até o término do ciclo, ao 7º ou 14º dia após a lesão. Fonte: a autora.

4.3. PROTOCOLO DE TRATAMENTO COM SERICINA

O protocolo de tratamento para os grupos a com sericina (SER e SER+LBP) iniciou imediatamente após a indução da queimadura, com creme de sericina a 4%, seguindo o princípio de dose eficaz mínima (Silva, 2010). O creme foi aplicado no leito da queimadura, em quantidade suficiente para cobrir

a lesão. Após a aplicação do tratamento, foi confeccionado um curativo oclusivo utilizando gaze estéril, fixada com esparadrapo. Os curativos foram trocados a cada 24 horas. Durante o procedimento, um experimentador continha o animal gentilmente com as mãos, enquanto o curativo anterior era cuidadosamente removido, previamente umedecido com soro fisiológico 0,9%. Quando necessário, eram realizadas fotografias da lesão, mantendo-se a área exposta pelo menor tempo possível.

Em seguida, procedia-se a limpeza da ferida com soro fisiológico 0,9%, iniciando pelo leito da lesão em direção às bordas, a fim de evitar contaminação. Nos grupos tratados com LBP, a aplicação ocorria nesse momento. Para os grupos que recebiam o creme de sericina, era aplicado uniformemente sobre todo o leito da queimadura. Posteriormente, a lesão era novamente coberta com gaze estéril, fixada com esparadrapo, e o animal era vestido com um colete para proteger o curativo.

A base para o creme foi formulada com vaselina branca, óleo mineral, lanolina, glicerina, bisabolol, estearato de trietanolamina, propilparabeno, metilparabeno e sericina a 4% (Aramwit; Sagnakul, 2007; Aramwit *et al.*, 2013). A formulação e preparado do creme foram realizados pelo Laboratório de Farmacotécnica e Cosmetologia da UNIOESTE – Cascavel.

O processo de extração da sericina do casulo da *B. mori* e liofilização para a produção do creme ocorreu no Laboratório de Bioquímica de Microrganismos da UNIOESTE - Cascavel, de acordo com o procedimento proposto por Debastiani et al. (2019).

3.4. PROTOCOLO DE TRATAMENTO COM SULFADIAZINA DE PRATA

O protocolo de tratamento para o grupo tratado com sulfadiazina de prata (SUL e SUL+LBP) também se iniciou imediatamente após a indução da queimadura.

Os animais foram tratados com pomada de sulfadiazina a 1%. A pomada era aplicada no leito da lesão em quantidade suficiente para cobrir a ferida. Após aplicação do tratamento, era confeccionado curativo oclusivo, com trocas a cada 24 horas. Semelhantemente aos animais tratados com sericina,

enquanto um experimentador o continha gentilmente com as mãos, o curativo anterior era removido cuidadosamente, sendo umedecido com soro fisiológico 0,9% quando necessário. Em seguida, eram realizadas as fotografias, mantendo a exposição da lesão pelo menor tempo possível. Após a remoção do curativo, procedia-se a limpeza da ferida com soro fisiológico 0,9%, iniciando pelo leito da lesão e avançando em direção às bordas, a fim de evitar contaminação. Nos grupos que recebiam o tratamento com LBP, a aplicação era feita nesse momento; para os grupos tratados com sulfadiazina, era aplicada uniformemente sobre todo o leito da queimadura. A área tratada era, então, coberta com gaze estéril, fixada com esparadrapo, e o animal era vestido com um colete para evitar a remoção do curativo pelos próprios animais.

Os coletes eram confeccionados em algodão cru, de 180 fios, com fechamento frontal em velcro, seguindo o modelo proposto por Borges et al. (2015, 2016), com adaptações. Todos os animais, independentemente do grupo experimental, utilizaram esse traje.

A pomada utilizada era de uso comercial, Dermazine® *Silvestre Labs*, formulada com álcool cetoestearílico, estearil éter, álcool oleílico etoxilado, metilparabeno, propilparabeno, vaselina, propilenoglicol, água deionizada e sulfadiazina de prata micronizada a 1%.

4.5. PROTOCOLO DE TRATAMENTO COM FOTOBIMODULAÇÃO

Para os grupos em que se realizou a fotobiomodulação (LBP, SUL+LBP E SER+LBP), o equipamento de escolha foi o *laserpulse* (Ibramed, 30 mW, 670 nm), e terapia pontual, em 4 pontos (vértices da lesão), com densidade de energia de 4 J/cm², em cada ponto, potência de 30 mW, irradiância de 1.07W/cm², por 10 segundos em cada vértice, ou seja, 1.2J de energia total entregue. A terapia iniciou-se 24h após a indução da queimadura e foi realizada a cada 48h, de acordo com o protocolo de Silveira et al. (2016 (Silveira et al., 2016) e Lamaro et al. (2019 (Lamaro-Cardoso et al., 2019)).

As trocas de curativo ocorreram da mesma forma para todos os animais, cada um recebendo seu respectivo tratamento, conforme relatado anteriormente.

4.6. AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA E DE EPITELIZAÇÃO

As avaliações macroscópicas das lesões foram realizadas iniciando-se no dia 1, imediatamente após a indução da lesão, e se repetiram a cada 24hs.

Os animais eram contidos manualmente pelo experimentador com exposição da área lesionada. Foi utilizada uma câmera fotográfica de 12 megapixels e uma abertura de f/2.2. A câmera era posicionada acima do animal, paralelamente a ele, a 20cm da mesa de apoio, fixada a um tripé. As lesões foram fotografadas para análise da redução da área da queimadura. As imagens capturadas eram transferidas para um computador, no qual foram analisadas por meio do programa *Image Pro Plus 6.0®*, por planimetria, analisando a evolução da área de lesão.

4.7. AVALIAÇÃO DA TEMPERATURA

Para avaliar a temperatura da área de lesão, utilizou-se uma câmera termográfica (*Flir C5 – Teledyne Flir*, Santa Barbara, Estados Unidos). A verificação desse dado ocorreu imediatamente após a queimadura e foi repetida a cada 48h, antes da aplicação dos tratamentos e após a limpeza do curativo. Foram realizadas as capturas da imagem termográfica antes da indução da lesão, para controle. A temperatura era verificada ao centro da lesão e, lateralmente, à borda externa da queimadura (Carrière et al., 2020; Jaspers et al., 2017; McGuiness, 2004), de maneira que sua análise foi realizada por meio do *Software Flir Thermal Studio 2.021*.

4.8. PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO DA DERME MICROSCOPIA DE LUZ

No 7º e 14º dia, os animais foram eutanasiados por aprofundamento anestésico, com cloridato de quetamina (95mg/Kg) e cloridato de xilazina (45mg/Kg) via injeção intraperitoneal. Após verificação do estado de

consciência do animal (observado pela ausência de resposta motora ao pinçamento da cauda e pregas interdigitais), foi realizada a coleta das amostras da pele íntegra e lesionada pela queimadura.

Após serem coletadas, as amostras de pele dos animais foram lavadas com álcool 70% e fixadas em formalina 10%. As peças foram, então, desidratadas em uma série crescente de álcoois (70%, 80%, 90%, 100% I, 100%II e 100%III), diafanizadas através do álcool xilol I, II e III e emblocadas em parafina histológica.

Posteriormente, foi realizada a microtomia obtendo-se cortes sagitais sequenciais de 5 µm em micrótomo *Olympus* (R CUT 4055 Tóquio, Japão) para obtenção de lâminas histológicas do tecido. As lâminas foram coradas em hematoxilina e eosina (HE) (De Campos et al., 2015), para análise histomorfométrica de epiderme e derme, e picrosírius *red* para análise de fibras colágenas. Após coloração, as lâminas foram analisadas e fotomicrografadas em microscópio de luz em objetiva de 40x, sendo fotografadas três amostras por animal na linha de transição da queimadura para a pele íntegra (*Olympus DP71*, Tóquio, Japão), para HE, e em microscópio de luz polarizada (*Zeiss Axio Scope A1*, *Zeiss Industrial Metrology*, Alemanha), sendo fotografadas em objetiva de 40x, três amostras por animal, em linha de transição, para as lâminas coradas com picrosírius.

Para analisar as lâminas coradas em HE, foi realizada uma análise semiquantitativa considerando os valores de 0 – 4 conforme escala na Figura 10 abaixo, seguindo o *score* utilizado por autores que também avaliaram queimaduras induzidas experimentalmente (Brassolatti et al., 2016; de Andrade et al., 2020; Otterço et al., 2018b, 2018a) e proposto por Robbins & Cottran (Kumar; Abbas; Aster, 2013). Para análise de expressão de colágeno, também foi considerada a escala proposta por Robbins & Cottran (Kumar; Abbas; Aster, 2013), por meio de análise semiquantitativa; para a avaliação do depósito de colágeno, foi contabilizada a porcentagem de pixels referentes à coloração de cada tipo de fibra colágena, na imagem capturada em fotomicrografia, sendo que as fibras do tipo I apresentam-se em coloração vermelho/amarelo ou laranja e as do tipo III evidenciam-se em tons de verde por birrefringência, quando a luz passa pelo filtro de polarização (Liu et al., 2021; Otterço et al., 2018b). A porcentagem de cada cor expressa em pixels foi realizada com base no software *GIMP 2.10.34*®.

Figura 10 – Score para avaliação de tecido de granulação e depósito de colágeno.

Score	Tecido de Granulação	Colágeno
0	Ausente	Ausente
1	Mínimo	Leve
2	Leve	Moderado
3	Moderado	Intenso
4	Intenso	

Imagem ilustrativa do método de avaliação de desenvolvimento de tecido de granulação e depósito de colágeno, proposto por Robbins & Cottrán (Kumar; Abbas; Aster, 2013). Os achados eram pontuados na análise de cada amostra avaliada e, posteriormente, plotados para análise estatística.

4.9. ANÁLISE DE PERFIL INFLAMATÓRIO

Para a análise de perfil inflamatório, foram utilizadas amostras de pele íntegra e lesionada de cada animal. As amostras foram coletadas após eutanásia, alocadas em criotubos e, então, congeladas em *ultra freezer* a -86°C (Indrel Ultra Freezer – 86°C, *Indrel Scientific* Londrina, Paraná). Foi analisada TNF- α , utilizando kit para ELISA, seguindo as instruções do fabricante, ou seja, 100 μ L de amostras diluídas ou padrão de TNF- α recombinante de rato foram adicionados à placa de 96 poços pré-revestida com anti-TNF- α e deixados por 2 horas em temperatura ambiente (TA). Após a lavagem, 100 μ L de anticorpo conjugado com biotina foram adicionados e deixados por 1 hora em TA. Após nova lavagem, 100 μ L de estreptavidina-peroxidase (HRP) foram adicionados e deixados por 30 minutos em TA, seguidos por lavagens adicionais. A reação foi, então, revelada pela adição de 100 μ L de cromogênio estabilizado,

encubado por 30 minutos em TA e, em seguida, foi interrompida pela adição de solução de parada. As leituras foram obtidas em um leitor de microplacas ELISA (VERSA Max, Molecular Devices, Califórnia, EUA) no comprimento de onda de 450 nm. As concentrações foram calculadas a partir de uma curva padrão preparada com TNF- α recombinante. O limite de detecção foi de 11,7–750 pg/mL para TNF- α (Keshri *et al.*, 2021).

A análise da expressão de Hsp70 foi realizada por *western blotting* também a partir de amostras de pele, coletadas e armazenadas conforme o descrito acima. As proteínas foram transferidas para membranas de difluoreto de polivinilideno (Bio-Rad Laboratories Inc., CA, EUA) e imunorreagidas com anticorpos policlonais de coelho anti-Hsp70 (Enzo Life Sciences, Inc., NY, EUA) ou anti- β -actina (Cell Signaling Technology, Danvers, EUA). As membranas foram incubadas com os respectivos anticorpos secundários. A quantidade de proteína na membrana foi quantificada por quimioluminescência (ImageQuant LAS 4000 mini, GE Healthcare, Tokyo, Japão), e os níveis de expressão foram registrados como razões em relação aos níveis de β -actina (Lee *et al.*, 2023).

4.10. ANÁLISE DO SISTEMA ANTIOXIDANTE

Para avaliação do sistema antioxidante, foram utilizadas amostras de pele íntegra e lesionada de cada animal. Foi retirada uma alíquota dessas amostras, armazenadas em microtubos com tampão de Tris-HCL, com pH ajustado para 7,4 e, então, novamente armazenadas a -80° C.

As amostras brutas foram, dessa forma, centrifugadas em microcentrífuga a 12.000 rpm (13.680 G) a 4°C, durante 12 minutos. O sobrenadante foi pipetado e acondicionado em novos microtubos. A determinação de proteínas seguiu o método de Bradford (1976). Com a determinação das concentrações de proteínas das amostras, foram normalizadas para 1mg de proteína para cada 1mL de amostra.

Foram analisadas as enzimas, superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT), além das espécies reativas e níveis de malondialdeído (produto aldeído derivado da peroxidação lipídica (TBARS) glutathiona peroxidase (GPx). Para a SOD, a análise seguiu o método proposto por Marklund & Marklund (MARKLUND; MARKLUND, 1974). Os resultados foram expressos em U de

SOD/mg de proteína. A atividade da catalase foi mensurada utilizando a taxa de decréscimo na absorbância do peróxido de hidrogênio a 240 nm (Silveira *et al.*, 2016); a peroxidação lipídica foi quantificada utilizando substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e expressa em equivalentes de malondialdeído (MDA). A absorbância foi mensurada a 535 nm utilizando um espectrofotômetro UV-Visível (Bio-Rad), e os valores foram expressos em nmol MDA/mg de proteína (Yadav *et al.*, 2020).

4.12. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada utilizando o software SPSS 20.0®. Os dados foram expressos em média $\pm$ desvio-padrão. As variáveis foram analisadas por Modelos Lineares Generalizados, com pós-teste LSD. A diferença foi considerada significativa quando o $p < 0,05$, com intervalo de confiança de 95%.

5. RESULTADOS

Avaliação macroscópica da área da lesão

Para análise da evolução da área da lesão, com relação aos grupos de animais que foram eutanasiados após sete dias da indução da lesão, observou-se que todos os grupos experimentais foram semelhantes, não havendo diferença entre eles ($p>0,05$). Entretanto, houve diferença estatística entre as avaliações ao longo do tempo de experimento, entre AV0 e as demais avaliações ($p<0,01$), e das avaliações AV1 e AV2, iguais estatisticamente ($p=0,295$) para AV3 ($p<0,01$), conforme ilustra a Figura 11 a seguir.

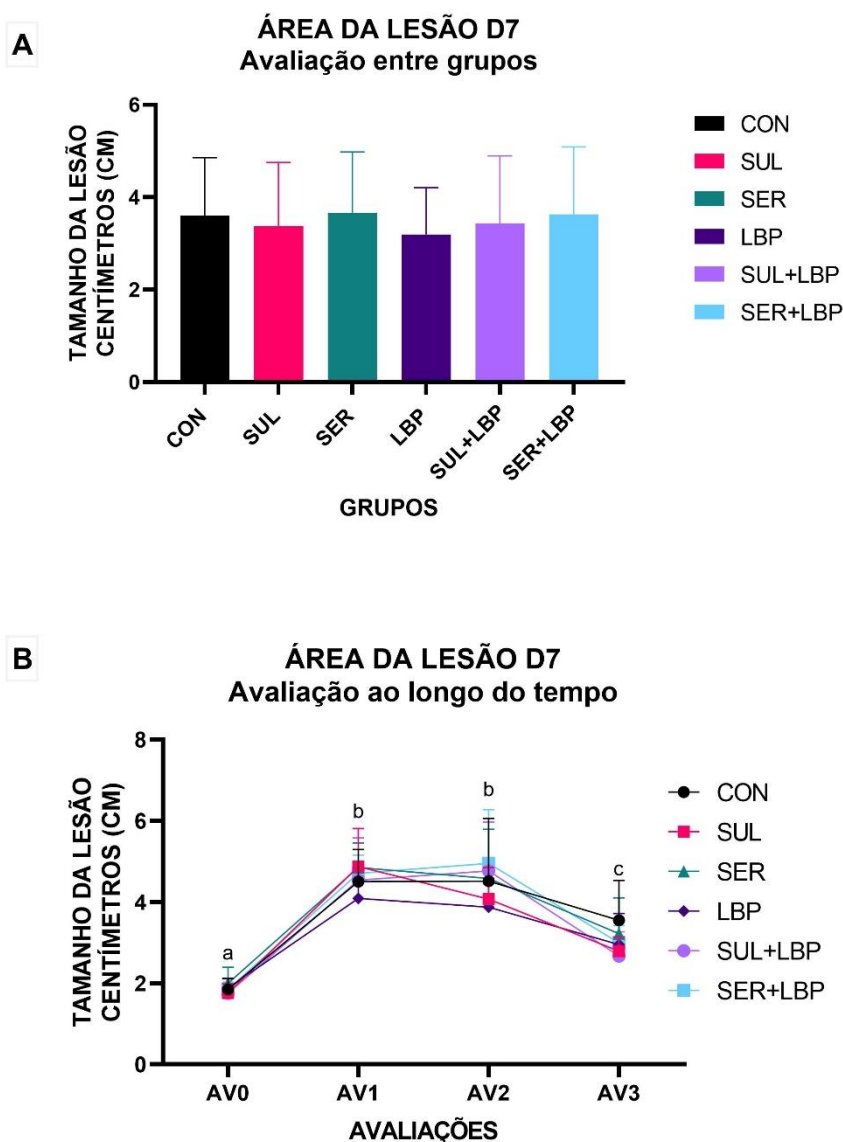


Figura 11 – Resultados das análises de área da lesão para os grupos de 7 dias. Gráficos demonstram a evolução da área da lesão. A: Avaliação da área entre os grupos. B: Avaliação da área da lesão ao longo do tempo de experimento. CON – controle, SUL – sulfadiazina, SER – sericina, LBP – laser, SUL+LBP – sulfadiazina+laser, SER+LBP – sericina+laser. Resultados expressos em média±desvio padrão, indicados pelas barras acima das colunas e linhas. Letras diferentes representam valores estatisticamente diferentes. Letras minúsculas, comparação dentro do mesmo grupo. Letras iguais apresentam semelhança estatística.

Figura 12 – Resultados das análises de área da lesão para os grupos de 14 dias. Gráficos demonstram a evolução da área da lesão. A: Avaliação da área entre os grupos. B: Avaliação da área da lesão ao longo do tempo de experimento. CON – controle, SUL – sulfadiazina, SER – sericina, LBP – laser, SUL+LBP – sulfadiazina+laser, SER+LBP – sericina+laser. Resultados expressos em média±desvio padrão, indicados pelas barras acima das colunas e linhas. Letras diferentes representam valores estatisticamente diferentes. Letras minúsculas, comparação dentro do mesmo grupo; letras maiúsculas, comparação entre os grupos, letras iguais apresentam semelhança estatística.

Avaliação da temperatura

Com relação à observação da temperatura do leito da lesão dos grupos de 7 dias, houve diferenças entre as avaliações, sendo que, com o aumento da temperatura da superfície da pele, logo após a indução da queimadura, AV1 foi estatisticamente diferente de todas as demais avaliações ($p<0,05$); a avaliação seguinte, após 48h, teve AV2 diferente de AV0 e AV1 ($p=0,044$ e $p<0,01$), mas igual a AV3 ($p=0,148$); juntamente à última avaliação, a AV4 foi semelhante a AV0 ($p>0,05$), conforme a Figura 13 - A. Não foi observada diferença entre os grupos ou interação entre as variáveis.

Na análise da diferença de temperatura do leito da lesão e da superfície da pele íntegra, ou seja, o delta, a avaliação inicial AV0 foi diferente das demais ($p<0,01$), assim como a AV1, realizada logo após a indução da queimadura, também foi diferente das demais ($p<0,01$), enquanto as avaliações subsequentes foram iguais estatisticamente ($p>0,05$), conforme ilustra a Figura 13 - B abaixo. Nessa análise, também não foi observada diferença entre grupos ou interações.

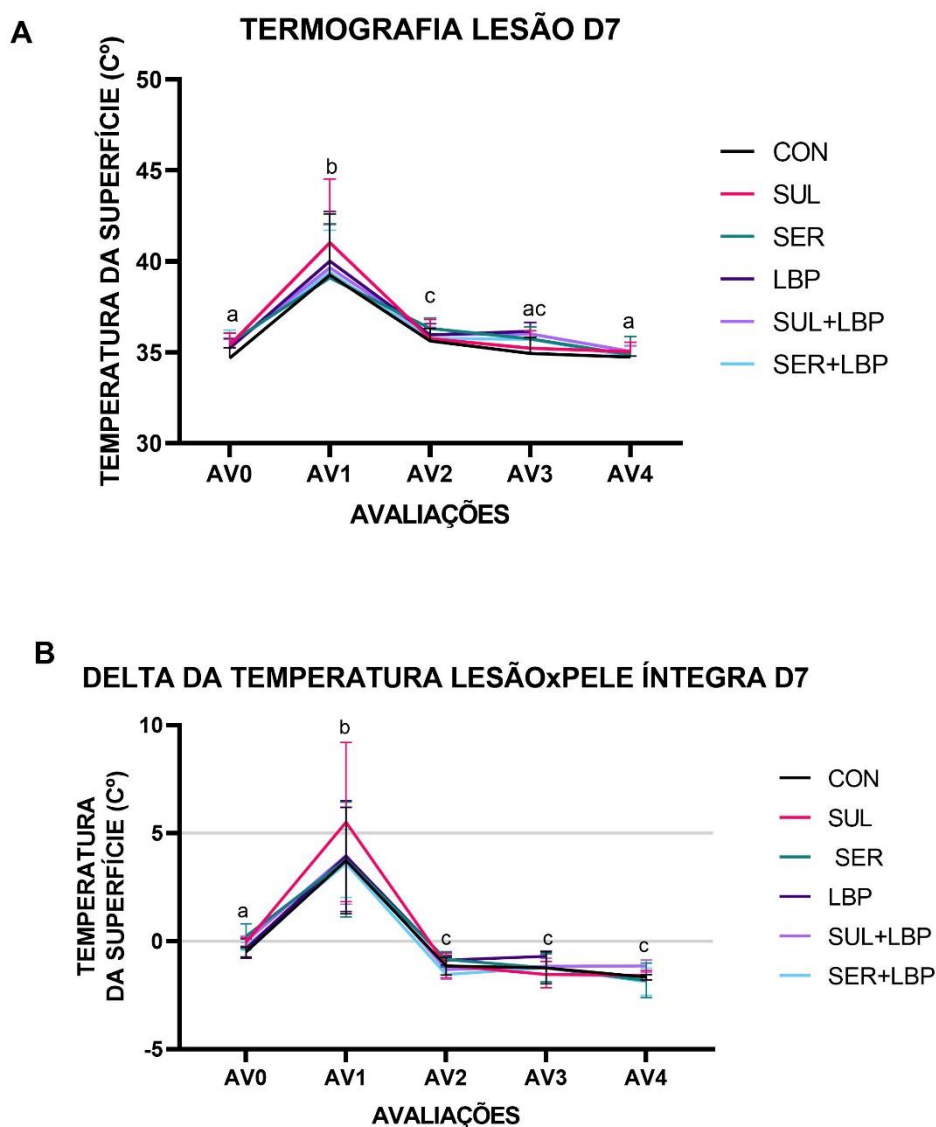


Figura 11 – Resultados das análises de temperatura da superfície da lesão e delta para os grupos de 7 dias. Gráficos demonstram a evolução da temperatura e o delta ao longo do tempo de experimento. A: Avaliação da temperatura da superfície da lesão entre os grupos. B: Avaliação do delta da temperatura entre leito da lesão e pele íntegra ao longo do tempo de experimento. CON – controle, SUL – sulfadiazina, SER – sericina, LBP – laser, SUL+LBP – sulfadiazina+laser, SER+LBP – sericina+laser. Resultados expressos em média±desvio padrão, indicados pelas barras acima das linhas. Letras diferentes representam valores estatisticamente diferentes. Letras minúsculas, comparação dentro do mesmo grupo. Letras iguais apresentam semelhança estatística.

Já quanto aos grupos de 14 dias, houve diferença entre a AV1 com as demais ($p < 0,05$), enquanto as outras avaliações foram semelhantes à inicial, AV0 ($p > 0,05$). Não foi observada diferença estatística na análise entre os grupos, porém, foi encontrada interação entre os grupos e as avaliações ao longo do tempo de experimento, uma vez que, após a indução da lesão, em AV1, todos os grupos apresentaram elevação da temperatura da superfície da pele ($p < 0,01$); após 48 horas, em AV2, e após 96 horas, em AV3, eles foram semelhantes a AV0 ($p > 0,05$); nas avaliações seguintes, os grupos ainda se apresentaram iguais a AV0 ($p > 0,05$), porém, diferentes de AV2 e AV3 ($p < 0,05$), conforme demonstra a Figura 12 - A

A respeito da análise de Delta da temperatura nos grupos de 14 dias, encontrou-se diferença estatística de AV0 para todas as outras avaliações ($p < 0,01$), AV1 para as demais ($p < 0,01$), enquanto AV2 e AV3 foram iguais entre si ($p = 0,760$), e AV4 até AV7 também foram semelhantes entre elas ($p > 0,05$). A seguir, Figura 12 – B ilustra esse resultado. Nessa análise, não foi observada diferença entre os grupos ou interações.

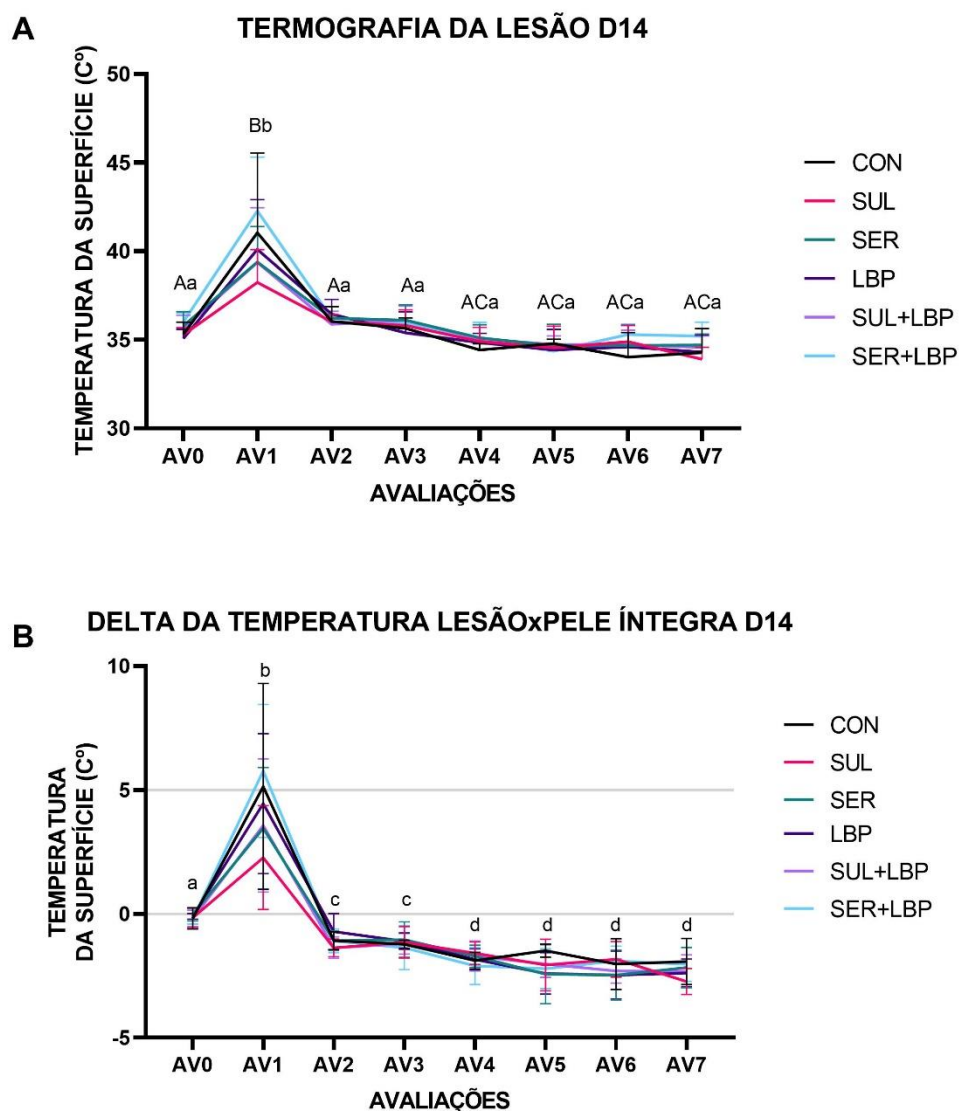


Figura 12 – Resultados das análises de temperatura da superfície da lesão e delta para os grupos de 7 dias. Gráficos demonstram a evolução da temperatura e o delta ao longo do tempo de experimento. A: Avaliação da temperatura da superfície da lesão entre os grupos. B: Avaliação do delta da temperatura entre leito da lesão e pele íntegra ao longo do tempo de experimento. CON – controle, SUL – sulfadiazina, SER – sericina, LBP – laser, SUL+LBP – sulfadiazina+laser, SER+LBP – sericina+laser. Resultados expressos em média±desvio padrão, indicados pelas barras acima das linhas. Letras diferentes representam valores estatisticamente diferentes. Letras minúsculas, comparação dentro do mesmo grupo; letras maiúsculas, comparação entre os grupos; letras iguais apresentam semelhança estatística.

Avaliação semiquantitativa histomorfológica

Para a análise de score de depósito de tecido de granulação, nos grupos de 7 dias, não houve diferença estatística entre os grupos ($p>0,05$), conforme ilustra a Figura 13. Na Figura 14, é possível visualizar a linha de transição entre queimadura e pele íntegra, em que ocorre a cessão da epiderme em todos os grupos e há a formação de membrana piogênica, migração de células de defesa, principalmente polimorfonucleares, e de fibroblastos em pequena quantidade.

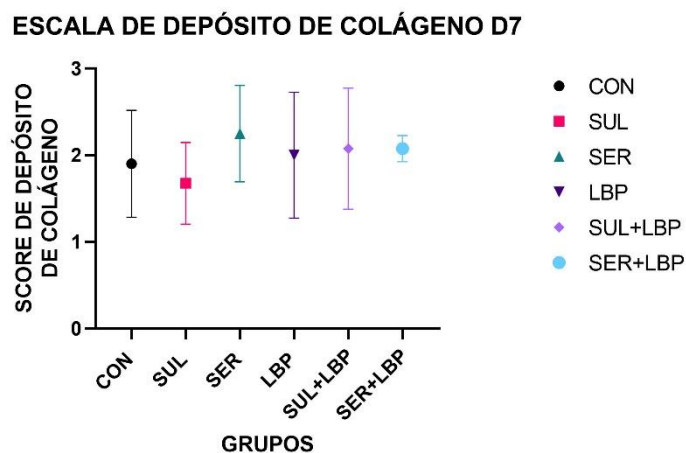


Figura 13 – Resultados das análises de tecido de granulação para os grupos de 7 dias. Gráfico demonstra o posicionamento dos grupos dentro da escala de formação de tecido de granulação. CON – controle, SUL – sulfadiazina, SER – sericina, LBP – laser, SUL+LBP – sulfadiazina+laser, SER+LBP – sericina+laser. Resultados expressos em média±desvio padrão, indicados pelas barras acima dos símbolos referentes a cada grupo.

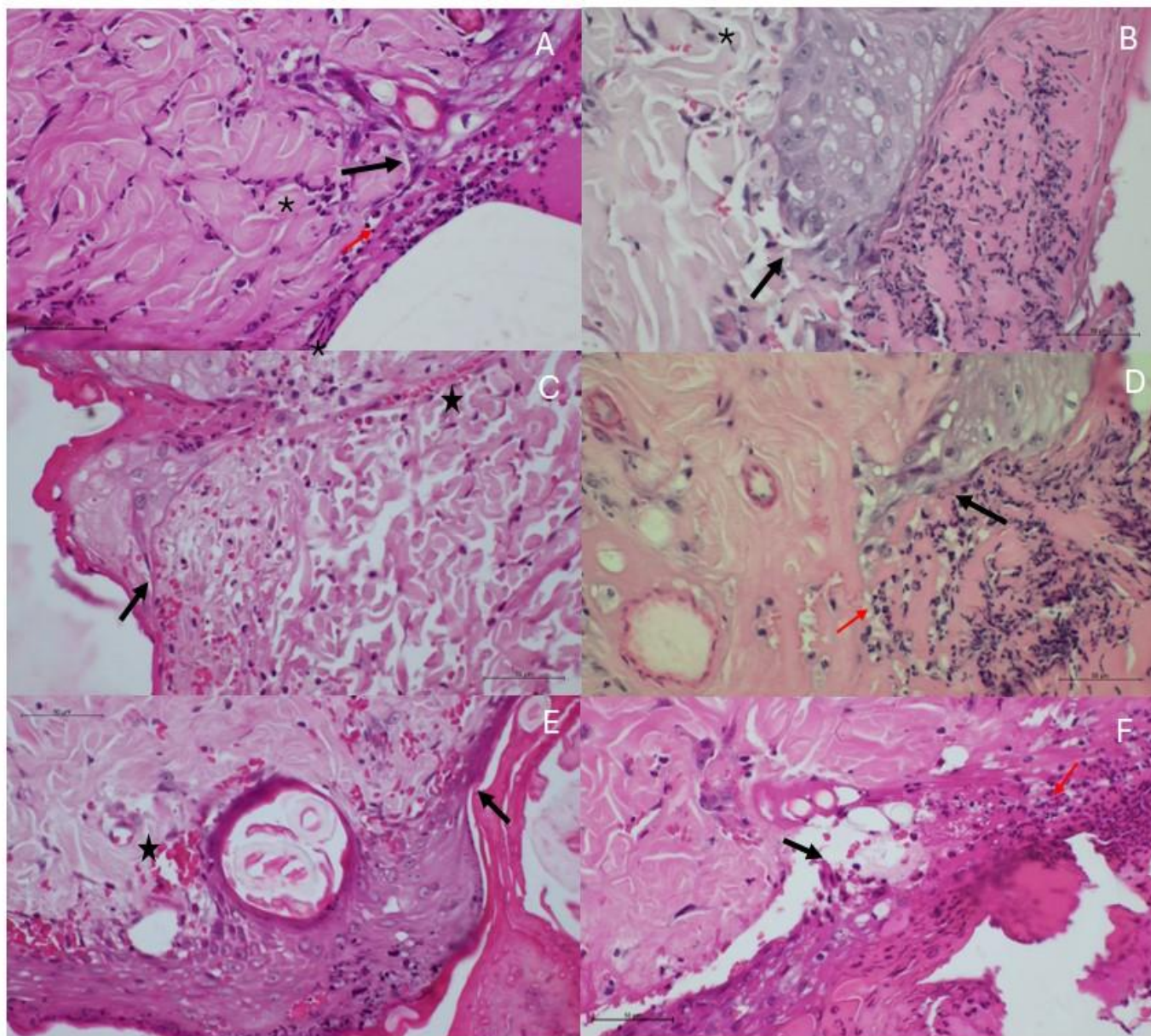


Figura 14 – Fotomicrografia da linha de transição da queimadura para pele íntegra de ratos Wistar dos grupos de 7 dias, em corte sagital corado em HE. A: CON – controle; B: SUL – sulfadiazina; C: SER – sericina; D: LBP – laser; E: SUL+LBP – sulfadiazina+laser; F: SER+LBP – sericina+laser. Estão representadas as linhas de transição (setas pretas), vasos sanguíneos (estrelas pretas), fibroblastos (asteriscos) e células de defesa (estrelas vermelhas).

Na análise do score de depósito de tecido de granulação dos grupos de 14 dias, também não houve diferença estatística entre os grupos ($p>0,05$), conforme ilustra a Figura 15, a seguir. Logo abaixo, na Figura 16, é possível visualizar novamente a linha de transição entre queimadura e pele íntegra, porém, em algumas amostras, já é possível observar a reepitelização no local. Em alguns grupos, ainda, há a membrana piogênica, migração de células de defesa já menos abundantes e de fibroblastos em grande quantidade em algumas amostras.

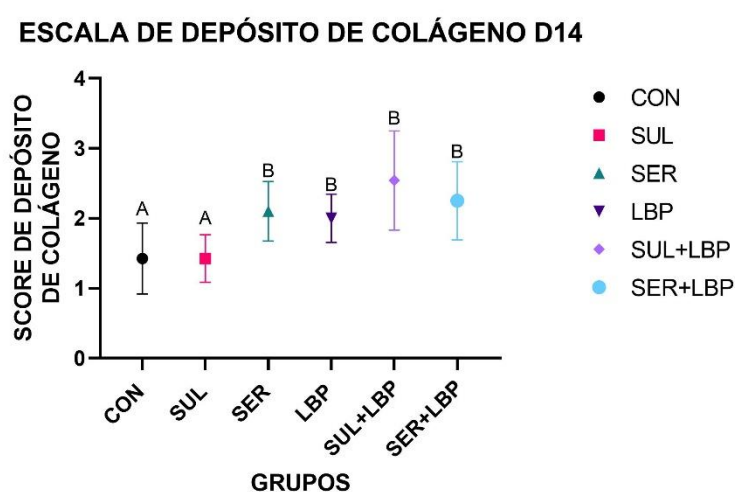


Figura 15 – Resultados das análises de tecido de granulação para os grupos de 14 dias. Gráfico demonstra o posicionamento dos grupos dentro da escala de formação de tecido de granulação. CON – controle, SUL – sulfadiazina, SER – sericina, LBP – laser, SUL+LBP – sulfadiazina+laser, SER+LBP – sericina+laser. Resultados expressos em média±desvio padrão, indicados pelas barras acima dos símbolos referentes a cada grupo.

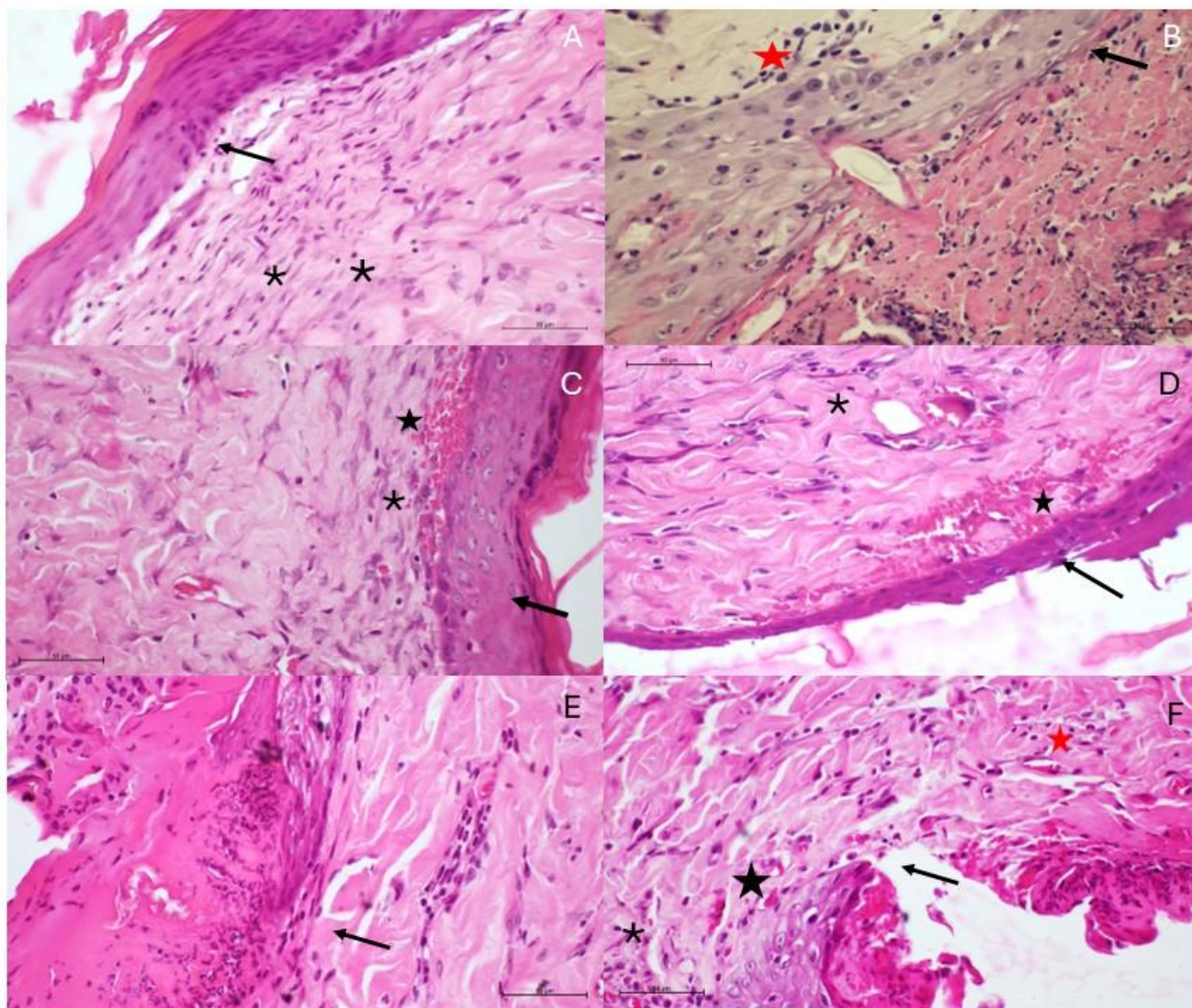
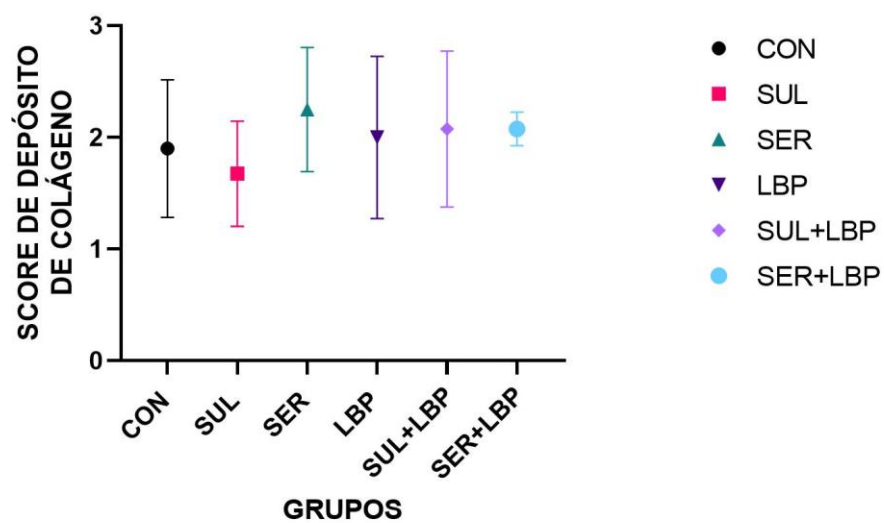


Figura 16 – Fotomicrografia da linha de transição da queimadura para pele íntegra de ratos Wistar dos grupos de 14 dias, em corte sagital corado em HE. A: CON – controle; B: SUL – sulfadiazina; C: SER – sericina; D: LBP – laser; E: SUL+LBP – sulfadiazina+laser; F: SER+LBP – sericina+laser. Estão representadas as linhas de transição (setas pretas), vasos sanguíneos (estrelas pretas), fibroblastos (asteriscos) e células de defesa (estrelas vermelhas).

Quanto à análise de depósito de colágeno para os grupos de 7 dias, não foi observada diferença estatística para a escala semiquantitativa entre os grupos ($p>0,05$) e, também, não houve diferença nas análises de percentagem de colágeno I e III entre os grupos, conforme é possível visualizar na Figura 17 A, B e C. Mais abaixo, a Figura 18 retrata a linha de transição da queimadura para pele íntegra em fotomicrografias de luz polarizada.

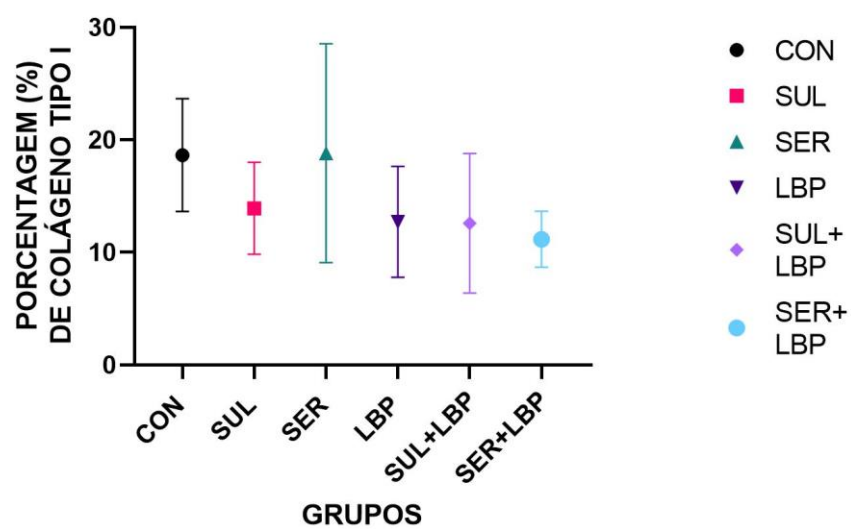
A

ESCALA DE DEPÓSITO DE COLÁGENO D7



B

COLÉGENO I D7



C

COLÁGENO III D7

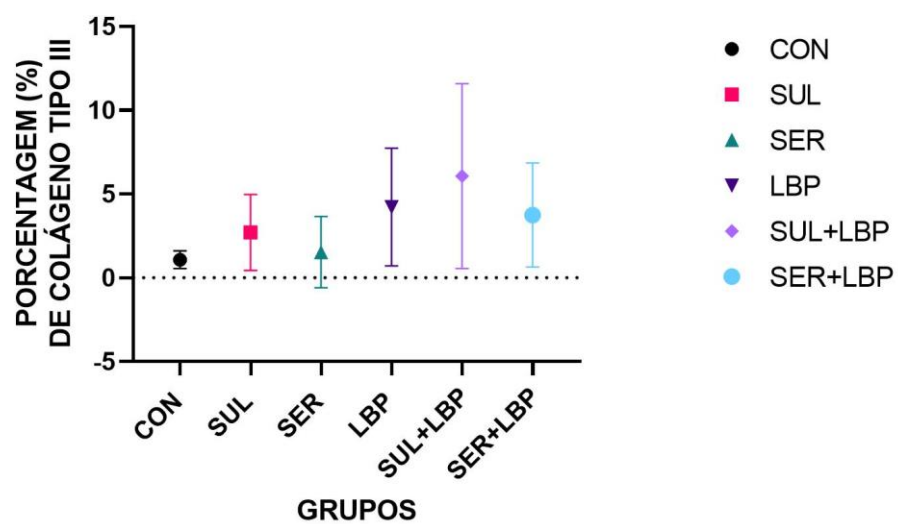


Figura 17 – Resultados das análises de depósito de colágeno para os grupos de 7 dias. Gráficos demonstram o posicionamento dos grupos dentro da escala de deposição de colágeno (A), porcentual de colágeno tipo I (B) e porcentual de colágeno tipo III (C). CON – controle, SUL – sulfadiazina, SER – sericina, LBP – laser, SUL+LBP – sulfadiazina+laser, SER+LBP – sericina+laser. Resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão, indicados pelas barras acima dos símbolos referentes a cada grupo.

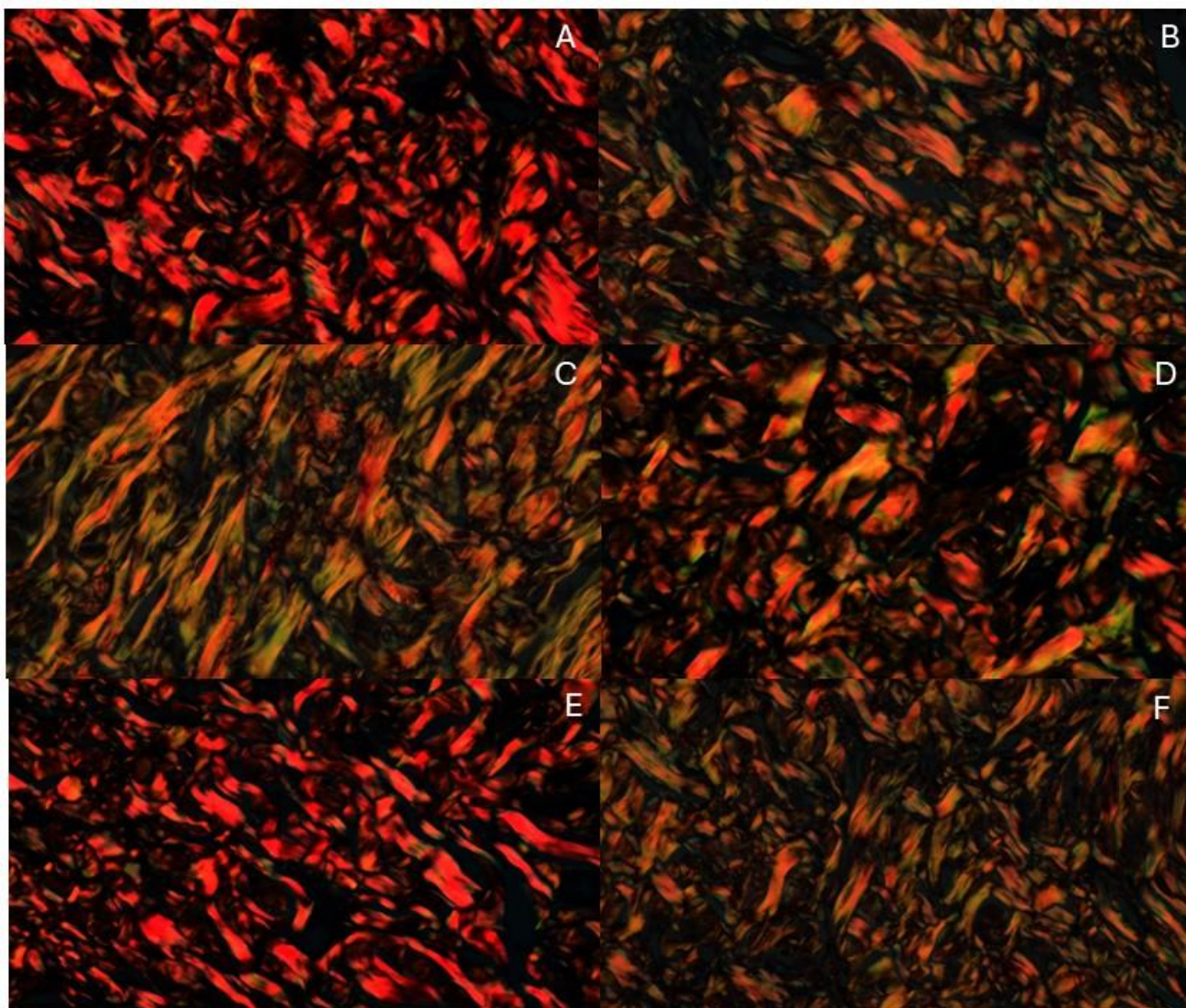


Figura 18 – Fotomicrografia da linha de transição da queimadura para pele íntegra de ratos Wistar dos grupos de 7 dias, em corte sagital corado com picrossírius. A: CON – controle; B: SUL – sulfadiazina; C: SER – sericina; D: LBP – laser; E: SUL+LBP – sulfadiazina+laser; F: SER+LBP – sericina+laser.

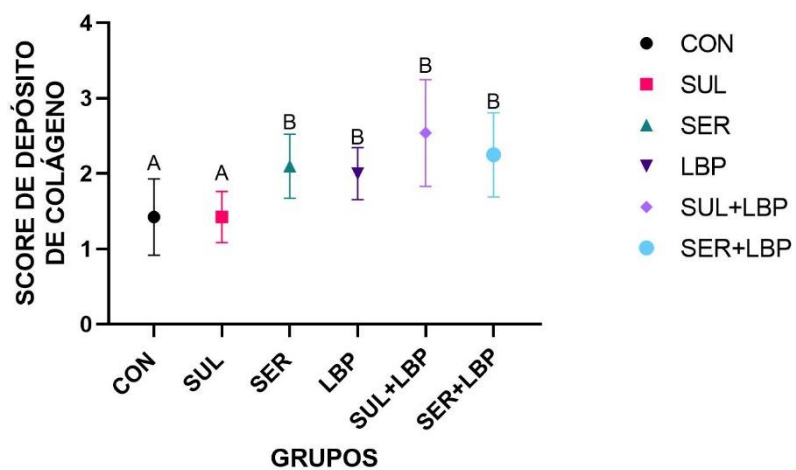
Já para as análises dos grupos de 14 dias, com relação ao score de depósito de colágeno, os grupos CON e SUL foram estatisticamente iguais ($p=1,0$), porém, diferentes dos demais grupos ($p<0,05$) que apresentaram maior depósito de colágeno, sendo que SER, LBP, SUL+LBP e SER+LBP foram iguais entre si ($p>0,05$), conforme ilustra a Figura 19 – A.

Quanto à porcentagem de colágeno tipo I, os grupos CON, SUL e SER foram semelhantes ($p>0,05$); SER+LBP apresentou maior porcentual de depósito de colágeno I e foi estatisticamente diferente de CON, SUL e SER ($p<0,03$). Os grupos LBP e SUL+LBP, iguais entre si ($p=0,693$), foram semelhantes a CON e SUL+LBP ($p>0,05$), mas diferentes de SER ($p<0,05$). Segue ilustração na Figura 19 – B.

Com relação ao depósito de colágeno III, não houve diferença estatística entre nenhum grupo ($p>0,05$), conforme Figura 19 – C. Abaixo, demonstra-se a linha de transição da queimadura para pele íntegra em fotomicrografias de luz polarizada.

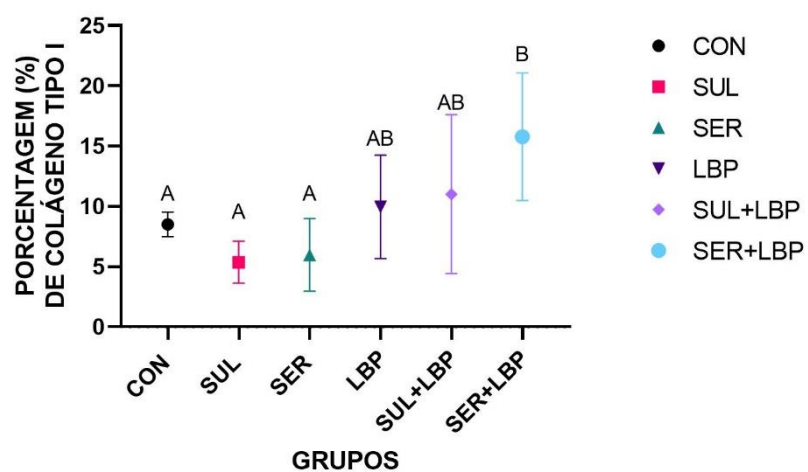
A

ESCALA DE DEPÓSITO DE COLÁGENO D14



B

COLÁGENO I D14



C

COLÁGENO III D14

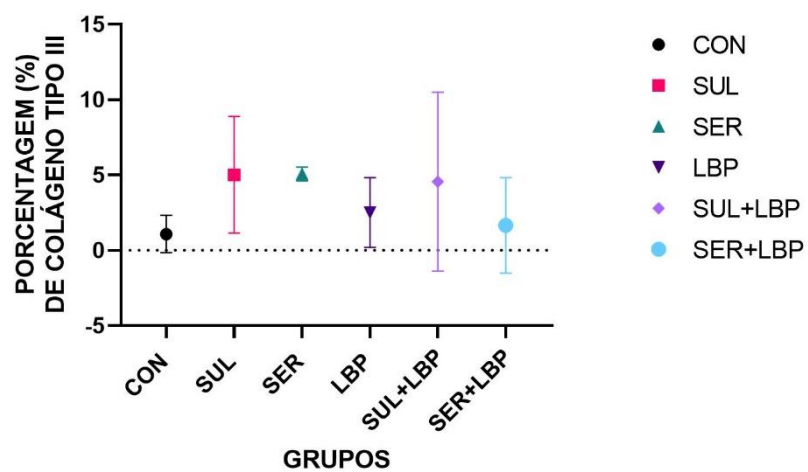


Figura 19 – Resultados das análises de depósito de colágeno para os grupos de 14 dias. Gráficos demonstram o posicionamento dos grupos dentro da escala de deposição de colágeno (A), porcentual de colágeno tipo I (B) e porcentual de colágeno tipo III (C). CON – controle, SUL – sulfadiazina, SER – sericina, LBP – laser, SUL+LBP – sulfadiazina+laser, SER+LBP – sericina+laser. Resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão, indicados pelas barras acima dos símbolos referentes a cada grupo. Letras diferentes representam valores estatisticamente diferentes. Letras minúsculas, comparação dentro do mesmo grupo; letras maiúsculas, comparação entre os grupos; letras iguais apresentam semelhança estatística.

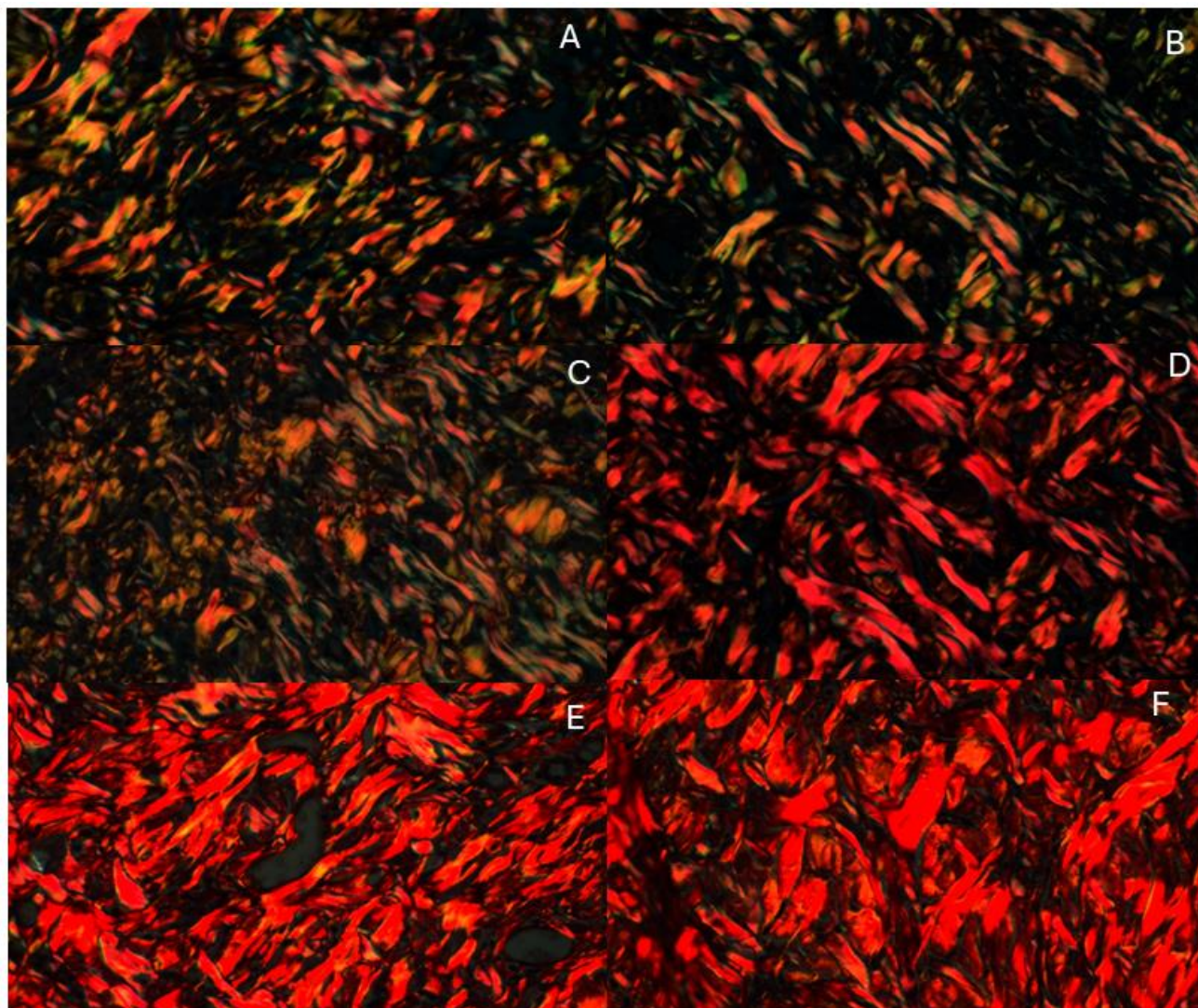
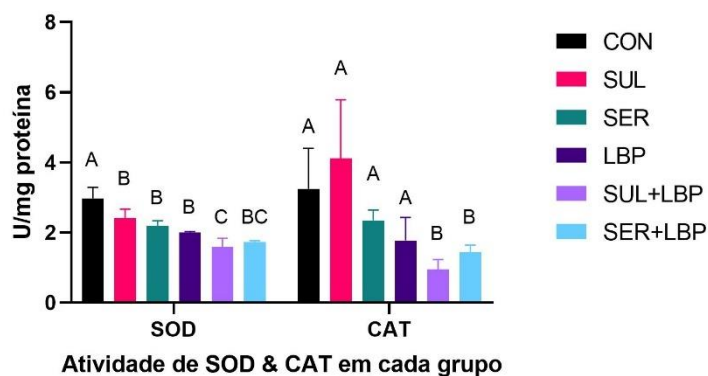


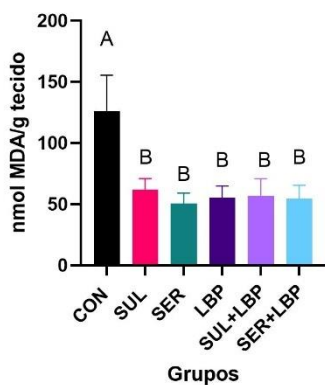
Figura 20 – Fotomicrografia da linha de transição da queimadura para pele íntegra de ratos Wistar dos grupos de 14 dias, em corte sagital corado com picrosírius. A: CON – controle; B: SUL – sulfadiazina; C: SER – sericina; D: LBP – laser; E: SUL+LBP – sulfadiazina+laser; F: SER+LBP – sericina+laser.

No que diz respeito à expressão de SOD, o grupo CON apresentou diferenças estatisticamente significativas em comparação com os outros grupos ($p < 0,05$). Já os grupos SUL, SER e PBM, não mostraram diferenças entre si ($p > 0,05$), enquanto SUL+PBM e SER+PBM foram semelhantes entre si ($p = 0,46$), mas distintos do grupo controle ($p < 0,001$). Na análise da expressão de CAT, não foram observadas diferenças entre os grupos CON, SUL, SER e PBM ($p > 0,05$), embora esses grupos tenham se diferenciado estatisticamente de SUL+PBM e SER+PBM ($p < 0,01$), sendo os últimos semelhantes entre si, com um valor de p igual a 0,9. Em relação aos níveis de TBARS, a única diferença estatística identificada foi entre o grupo controle CON e todos os outros grupos ($p < 0,01$), enquanto os demais não apresentaram diferenças entre si ($p = 1$). Na análise de $\text{TNF-}\alpha$, os grupos CON, SUL e SER mostraram-se equivalentes ($p > 0,05$), enquanto os grupos PBM, SUL+PBM e SER+PBM foram semelhantes entre si ($p < 0,05$), mas diferentes dos três primeiros grupos ($p < 0,05$), como ilustrado na figura abaixo.

A Atividade SOD & CAT



B TBARS



C $\text{TNF-}\alpha$

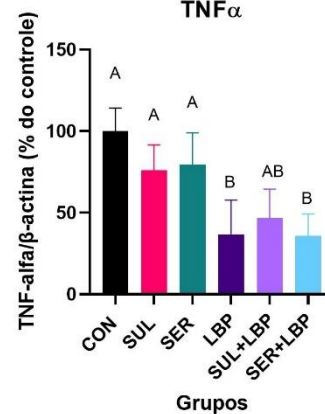


Figura 21 – Resultados das análises de atividade e expressão de SOD, CAT, TBARS e TNF α para os grupos de 14 dias. A – U/mg de proteína das enzimas SOD e CAT nos tecidos coletados; B – nmol MDA de TBARS por grama de tecido analisado; C – expressão de TNF α . CON – controle, SUL – sulfadiazina, SER – sericina, LBP – laser, SUL+LBP – sulfadiazina+laser, SER+LBP – sericina+laser. Resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão, indicados pelas barras acima dos símbolos referentes a cada grupo. Letras diferentes representam valores estatisticamente diferentes; letras maiúsculas, letras iguais apresentam semelhança estatística.

Quanto à expressão de Gpx, não houve diferença estatística entre nenhum grupo analisado ($p>0,05$). Para Nrf2, o grupo CON apresentou diferenças estatisticamente significativas em comparação com os outros grupos ($p<0,01$); os grupos SUL, SER e PBM não mostraram diferenças entre si ($p>0,05$), enquanto SUL+PBM e SER+PBM foram semelhantes entre si ($p=1$). Na análise de Hsp70, o grupo CON foi diferente estatisticamente de todos os demais grupos ($p<0,05$), assim como o grupo SUL ($p<0,05$), ao que SER, LBP, SUL+LBP e SER+LBP foram iguais ($p=1$). Na análise de BAX, CON e SUL foram iguais ($p=1$), SER foi igual estatisticamente a SUL ($p=0,274$), LBP, SUL+LBP e SER+LBP foram iguais ($p>0,05$). Em relação aos níveis de Caspase clivada, CON, SUL e SER foram iguais ($p>1$), LBP e SUL+LBP iguais entre si ($p=1$), SER+LBP foi semelhante a LBP ($p=0,06$), porém, diferente de SUL+LBP ($p<0,05$). A análise de ER apontou que CON e SUL foram iguais ($p>0,05$), SER e LBP apresentam-se iguais entre si ($p=1$) semelhantes a SUL ($p=0,4$), mas diferentes de CON ($p<0,05$), e SUL+LBP e SER+LBP foram semelhantes um ao outro ($p>0,05$) e diferentes de todos os demais ($p<0,05$), conforme ilustra a figura a seguir.

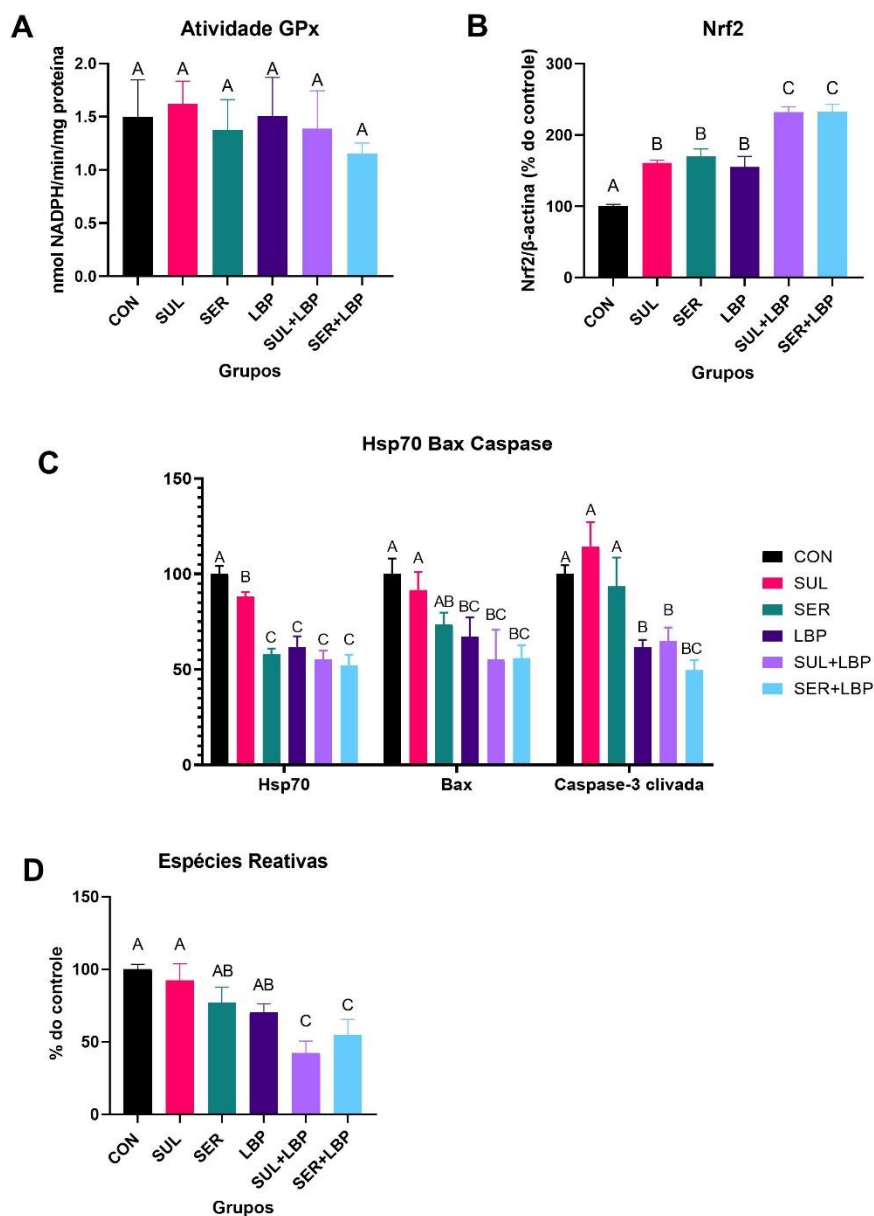


Figura 22 – Resultados das análises de atividade e expressão de GPx, Nrf2, Hsp70, Bax, Caspase clivada e Espécies Reativas para os grupos de 14 dias. A – nmol NADPH/mg de proteína de GPx nos tecidos coletados; B – concentração de Nrf2 ; C – atividade de Hsp70, BAX e Caspase nos tecidos coletados; D – concentração de EROs. CON – controle, SUL – sulfadiazina, SER – sericina, LBP – laser, SUL+LBP – sulfadiazina+laser, SER+LBP – sericina+laser. Resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão, indicados pelas barras acima dos símbolos referentes a cada grupo. Letras diferentes representam valores estatisticamente diferentes; letras maiúsculas, letras iguais apresentam semelhança estatística.

6. DISCUSSÃO

Resumindo os resultados, foi observado que, embora não houvesse diferenças de temperatura entre os grupos — possivelmente devido à termorregulação dos animais — e que a área da lesão não tenha diminuído de forma significativa nos grupos experimentais, notou-se uma aceleração no processo inflamatório nesses grupos. Isso pode ser atribuído à deposição de matriz extracelular, bem como à redução na concentração de enzimas antioxidantes e $\text{TNF}\alpha$, comportamentos que podem ter sido estimulados pelos tratamentos aplicados.

Considerando a estrutura da pele e as queimaduras, como um dos traumas mais debilitantes que causa a destruição dos tecidos acometidos (Abdullahi; Amini-Nik; Jeschke, 2014b), a resolução dessas lesões ocorre por meio de fases que são dinâmicas e se sobrepõem. Logo após o trauma, o processo de hemostasia é acionado por meio da vasoconstrição local, seguido pela ativação e agregação das plaquetas. Além disso, há a liberação de diversos fatores (tromboxano A₂, IL-1 β , IL-1, $\text{TNF}\alpha$) por parte das plaquetas, queratinócitos, macrófagos e fibroblastos, que culmina na formação de um coágulo e dá início à fase seguinte, a inflamatória (Jeschke et al., 2020). Essa fase ocorre de maneira natural para degradar o tecido necrótico e iniciar a cascata de sinais necessários para a reparação da lesão.

Durante esse processo, células, como monócitos, macrófagos e neutrófilos, são recrutadas. Neutrófilos e macrófagos liberam citocinas e quimiocinas, incluindo IL-1 β , IL-8 e $\text{TNF}\alpha$, que são responsáveis por promover a liberação de IL-6. Além disso, eles liberam fatores de crescimento, como TGF β , que são fundamentais para o recrutamento de fibroblastos. Esses fibroblastos, por sua vez, secretam o IGF (fator de crescimento semelhante à insulina) e o VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) (Evers; Bhavsar; Mailänder, 2010; Jeschke et al., 2020; Khosroshahi et al., 2019).

Quanto à termografia, um indicativo sensível de processos inflamatórios ativos (Casas-Alvarado et al., 2020), esta análise também apresentou padrões temporais distintos. Nos grupos de 7 dias, observou-se um aumento da temperatura da superfície da pele logo após a indução da queimadura (AV1), diferindo estatisticamente de todas as demais avaliações ($p < 0,05$). A AV2 (48h) diferenciou-se de AV0 e AV1 ($p = 0,044$ e $p < 0,01$), mas foi semelhante à AV3

($p=0,148$), que, juntamente com a AV4, assemelhou-se à AV0 ($p>0,05$). Não foram observadas diferenças entre os grupos ou interações, sugerindo que, na primeira semana, a resposta térmica aguda é o fator preponderante.

Similarmente, para os grupos de 14 dias, a AV1 apresentou elevação significativa da temperatura ($p<0,05$), diferindo das demais, que foram semelhantes à AV0 ($p>0,05$). Embora não houvesse diferença estatística entre os grupos, uma interação significativa entre grupos e avaliações foi detectada. Todos os grupos demonstraram elevação da temperatura em AV1 ($p<0,01$). Contudo, em AV2 (48h) e AV3 (96h), retornaram à semelhança com AV0 ($p>0,05$). Nas avaliações subsequentes, os grupos permaneceram semelhantes a AV0 ($p>0,05$), mas diferiram de AV2 e AV3 ($p<0,05$). Essa interação temporal pode indicar que, a longo prazo, os tratamentos podem influenciar sutilmente a dinâmica da resposta térmica, talvez, modulando a inflamação de maneira mais eficaz à medida que a fase aguda se resolve. A análise do delta de temperatura (lesão versus pele íntegra) reforça a fase aguda da inflamação, com AV0 e AV1 diferindo significativamente das demais em ambos os períodos (7 e 14 dias), e as avaliações subsequentes retornando à homeostase térmica (Mertin *et al.*, 2022).

Em relação à expressão de TNF α nos tecidos analisados, constatou-se que os grupos experimentais submetidos a tratamentos com fotobiomodulação, sejam eles isolados (LBP) ou combinados (SUL+LBP e SER+LBP), apresentaram redução nos níveis dessa citocina. Especificamente, os grupos CON, SUL e SER mostraram-se equivalentes ($p>0,05$), enquanto os grupos LBP, SUL+LBP e SER+LBP foram semelhantes entre si ($p<0,05$), mas significativamente diferentes dos três primeiros grupos ($p<0,05$). Esses achados estão alinhados com estudos anteriores (Gupta *et al.*, 2015; Jin *et al.*, 2017), embora tenham avaliado apenas a fotobiomodulação como tratamento, sem considerar a combinação com sulfadiazina e sericina.

A diminuição do TNF α nos grupos tratados com LBP e suas combinações sugere uma aceleração na resolução do processo inflamatório, uma vez que níveis mais elevados dessa citocina estão associados às fases iniciais da cicatrização de queimaduras (Rowan *et al.*, 2015b). Os benefícios terapêuticos da PBM são exercidos por meio da absorção de luz vermelha ou NIR pelos cromóforos mitocondriais presentes na cadeia respiratória (Mosca *et al.*, 2019), com efeitos inibitórios sobre marcadores inflamatórios, como TNF α e

IL1 β (Avci et al., 2013; Lamaro-Cardoso et al., 2019), e modulação da atividade de macrófagos M1 e M2 (Strizova et al., 2023).

A sulfadiazina de prata também possui propriedades anti-inflamatórias, o que modula a resposta imune via interação com proteínas e enzimas em células imunes, afetando vias de sinalização fundamentais para a transcrição de genes pró-inflamatórios, como a do NF- κ B (Heyneman et al., 2016; Stepkowski; Brzóška; Kruszewski, 2014; Banerjee et al., 2019). A sericina, por sua vez, inibe a ativação de NF- κ B e modula as proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK), resultando em uma *down-regulation* de TNF- α (Ampawong et al., 2023; Jeong et al., 2023; Sun et al., 2023). A sinergia desses mecanismos nos tratamentos combinados (SUL+LBP e SER+LBP) pode explicar a redução mais acentuada de TNF- α (Heyneman et al., 2016; Jeong et al., 2023).

Paralelamente à modulação da inflamação, a atenuação do estresse oxidativo foi observado nos animais tratados. No que diz respeito às substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, TBARS, biomarcador da lipoperoxidação, a análise após 14 dias da indução da lesão, revelou que a única diferença estatística identificada foi entre o grupo controle (CON) e todos os outros grupos ($p < 0.01$), enquanto os demais grupos não apresentaram diferenças entre si ($p > 0,05$). Esse resultado efetiva-se como interessante, pois indica que todos os tratamentos (SUL, SER, LBP e suas combinações) foram eficazes em reduzir o dano oxidativo inicial causado pela queimadura, possivelmente, por meio de diferentes mecanismos, incluindo a ação antioxidante direta da sericina (Aramwit et al., 2009) e a modulação da resposta inflamatória pela sulfadiazina (Banerjee et al., 2019) e pelo LBP (Otterço et al., 2018b). A persistência de TBARS elevados apenas no grupo que não recebeu tratamento sublinha o papel protetor dos tratamentos contra o estresse oxidativo.

A análise das enzimas antioxidantes complementa esses achados. Observamos uma redução gradual na concentração de SOD e CAT nos tecidos dos animais dos grupos de 14 dias. Para a SOD, o grupo CON14 apresentou diferenças estatisticamente significativas em comparação com os outros grupos ($p < 0,05$), com os grupos SUL, SER e LBP em diferenças entre si ($p > 0,05$), e SUL+LBP e SER+LBP semelhantes ($p = 0.46$), mas distintos do grupo controle ($p < 0,001$). Para a CAT, não foram observadas diferenças entre CON, SUL,

SER e LBP ($p>0,05$), mas esses grupos diferenciaram-se estatisticamente de SUL+LBP e SER+LBP ($p<0,01$), sendo esses últimos semelhantes entre si ($p=0,9$). A diminuição mais intensa na expressão de SOD e CAT nos grupos combinados (SUL+LBP e SER+LBP) pode ser interpretada como um indicativo de que a sobrecarga de EROs foi mitigada.

Se há menos superóxido e peróxido de hidrogênio para serem convertidos, a demanda pela produção massiva dessas enzimas pelo organismo é reduzida, refletindo um ambiente redox mais equilibrado (Yadav *et al.*, 2020). Por outro lado, a análise da GPx não revelou diferenças de estatísticas entre nenhum dos grupos analisados ($p>0,05$). Esse resultado sugere que, embora a GPx seja uma enzima antioxidante crucial, sua expressão ou atividade pode não ter sido o principal mecanismo modulado pelos tratamentos nessa janela de tempo do experimento, ou que outros sistemas antioxidantes compensatórios assumiram um papel mais proeminente. Isso é apontado por alguns pesquisadores, que analisaram o sistema antioxidante relacionado a GPx e outras enzimas, e verificaram uma modulação mais proeminente realizada por outros fatores, como o Nrf2 (Yadav *et al.*, 2018, 2020, 2021).

Dessa forma, os presentes resultados revelaram uma tendência de aumento na concentração de Nrf2 nos grupos tratados. O grupo CON apresentou diferenças significativas em comparação com os outros grupos ($p<0,01$), enquanto SUL, SER e LBP não mostraram diferenças entre si ($p>0,05$), e SUL+LBP e SER+LBP foram semelhantes ($p=1$). O Nrf2 atua como regulador da resposta ao estresse oxidativo, orquestrando a transcrição de uma vasta gama de genes citoprotetores e antioxidantes, incluindo SOD, CAT e heme oxigenase-1 (HO-1) (Süntar *et al.*, 2021). A sericina e a fotobiomodulação são descritas por sua capacidade de ativar essa via (Tian; Chen; Zhao, 2025; Yadav *et al.*, 2020). Assim, a maior concentração de Nrf2 nos grupos tratados indica uma ativação das defesas antioxidantes endógenas, o que contribui para a redução do dano oxidativo evidenciado pelos TBARS e para a modulação das enzimas SOD e CAT.

Quanto à análise das Espécies Reativas (EROs), demonstrou uma redução geral nos grupos tratados. CON e SUL foram iguais ($p>0,05$), SER e LBP foram iguais entre si ($p=1$), semelhantes a SUL ($p=0,4$), mas diferentes de CON ($p<0,05$). SUL+LBP e SER+LBP foram semelhantes entre si ($p>0,05$) e

diferentes de todos os demais ($p < 0.05$). É notável que, apesar da redução global das ERs, o grupo SER+LBP apresentou um pequeno, porém, não significativo aumento. A diminuição das EROs na maioria dos grupos tratados corrobora a eficácia dos tratamentos em neutralizar ou diminuir a produção dessas espécies oxidantes e potencialmente danosas. Esse achado está em consonância com a redução dos TBARS e com a potencial ativação da via Nrf2, destacando a capacidade dos tratamentos em reestabelecer o balanço redox celular e prevenir danos oxidativos (Tian; Chen; Zhao, 2025).

Já em termos de morte celular programada, os resultados para BAX e Caspase Clivada foram convergentes e indicam um efeito protetor dos tratamentos. Houve uma redução na concentração de BAX nos grupos tratados, com CON e SUL sendo iguais ($p=1$), SER igual a SUL ($p=0,274$), e LBP, SUL+LBP e SER+LBP iguais entre si ($p > 0,05$). A Caspase Clivada, um marcador direto da atividade apoptótica, também demonstrou redução, com CON, SUL e SER iguais ($p > 1$), LBP e SUL+LBP iguais ($p=1$), e SER+LBP semelhante a LBP ($p=0,06$), mas diferente de SUL+LBP ($p < 0,05$). A menor expressão de BAX — proteína pró-apoptótica responsável por promover a permeabilização da membrana mitocondrial externa, permitindo a liberação de fatores que ativam as caspases e desencadeiam a apoptose, sendo, portanto, essencial para a remoção de células danificadas —, associada à redução da atividade das caspases, observada nos grupos tratados, especialmente naqueles que receberam fotobiomodulação e suas combinações, sugere uma atenuação da via pró-apoptótica (Song; Wang, [s.d.]).

Dessa forma, este resultado indica uma otimização da viabilidade celular e da regeneração tecidual em lesões por queimadura, conforme observado em um estudo recente (Kesavardhana; Subbarao Malireddi; Kanneganti, 2025).

A análise da HSP70 revelou uma redução estatisticamente significativa nos grupos tratados. Os grupos CON e SUL diferiram de todos os demais grupos ($p < 0,05$), enquanto SER, LBP, SUL+LBP e SER+LBP foram estatisticamente iguais ($p=1$). A HSP70, uma chaperona molecular citoprotetora induzida por estressores, como estresse oxidativo e inflamação, desempenha um papel importante na manutenção da homeostase proteica e na prevenção da apoptose (Lee *et al.*, 2023). A diminuição desses níveis nos grupos tratados, especialmente nos combinados, pode ser interpretada como um indicativo da eficácia dos tratamentos em atenuar o estresse celular global, pois um

ambiente tecidual menos estressado e danificado requer uma menor indução dessas proteínas de resgate, refletindo um retorno mais rápido à homeostase (Yoo *et al.*, 2017).

Já na fase de proliferação, que culmina na formação de uma matriz celular definitiva e processos de angiogênese e epitelização, é marcada pela transformação de fibroblastos em miofibroblastos (Evers; Bhavsar; Mailänder, 2010; Jeschke *et al.*, 2020). Em seguida, inicia-se a fase de remodelamento, em que o amadurecimento do tecido de granulação e a formação da cicatriz ocorrem com a deposição e reajuste de colágeno e elastina, remodelados sob a influência de inibidores de metaloproteases (TIMP), o que resulta no aumento da resistência à tração (Jeschke *et al.*, 2020; Rowan *et al.*, 2015a).

Assim, a análise da histologia e do depósito de colágeno, nos grupos de 14 dias, revelou achados cruciais para a qualidade do reparo tecidual. Para o score de depósito de tecido de granulação, não houve diferença estatística entre os grupos ($p > 0.05$). No entanto, com relação ao score de depósito de colágeno, os grupos CON e SUL foram estatisticamente iguais ($p = 1.0$), porém, diferiram dos demais grupos ($p < 0.05$), que apresentaram maior depósito de colágeno (SER, LBP, SUL+LBP, SER+LBP), ou foram iguais entre si ($p > 0.05$). Este achado é fundamental, pois indica que os tratamentos (isolados e combinados, exceto a sulfadiazina isolada) foram capazes de promover uma maior deposição geral de colágeno.

A análise mais aprofundada dos tipos de colágeno reforça essa observação. Para o colágeno Tipo I, os grupos CON14, SUL14 e SER14 foram semelhantes ($p > 0.05$), enquanto SER+LBP14 apresentou o maior percentual de depósito, diferenciando-se estatisticamente dos demais ($p < 0.03$). Os grupos LBP14 e SUL+LBP14 foram semelhantes entre si ($p = 0.693$), assemelhando-se a CON14 e SER+LBP14 ($p > 0.05$), mas diferindo de SER14 ($p < 0.05$). Este padrão sugere que a combinação Sericina+LBP foi particularmente eficaz na promoção da deposição de colágeno Tipo I, um componente essencial da fase de remodelamento e que confere resistência tênsil à cicatriz (Rowan *et al.*, 2015a).

Em contraste, não houve diferença no depósito de colágeno Tipo III entre nenhum dos grupos ($p > 0.05$). Isso é consistente com a fisiologia da cicatrização, em que o colágeno Tipo III é abundante nas fases iniciais e progressivamente substituído pelo Tipo I, durante o remodelamento (Zhang *et*

al., 2015). A maior deposição de colágeno total e, notavelmente, de colágeno Tipo I, nos grupos tratados em 14 dias, demonstra uma qualidade superior da matriz extracelular e uma aceleração do processo de resolução da lesão, alinhando-se com estudos que mostram a sinergia entre tratamentos, como LBP e sericina, na estimulação fibroblástica pelas vias, como MAPK/ERK e TGF- β /Smad, que regulam genes de colágeno (Aramwit et al., 2009, 2010; Nagai et al., 2018).

Para os grupos de animais eutanasiados após sete dias (D7) da indução da lesão, a avaliação da área da lesão não revelou diferenças estatísticas significativas entre os grupos experimentais, tampouco em relação ao controle ($p>0,05$). No entanto, observou-se uma evolução temporal da lesão. As dimensões da lesão, na avaliação inicial (AV0), distinguiram-se significativamente das demais avaliações ($p<0,01$), enquanto as avaliações AV1 e AV2, realizadas logo após a indução da queimadura e 24 horas depois, respectivamente, foram estatisticamente semelhantes entre si ($p=0,295$), mas diferiram da AV3 (48 horas), que já mostrava uma redução significativa da área ($p<0,01$). Esse padrão sugere que, na primeira semana pós-queimadura, a dimensão macroscópica da lesão ainda se encontra em um período de estabilização e desbridamento inicial, no qual os efeitos dos tratamentos na contração da ferida não se manifestam distintamente entre os grupos, embora a progressão natural da cicatrização seja observada, assim como observado por outro estudo que analisou a progressão da resolução das queimaduras (ter Horst et al., 2018).

Em contrapartida, nos animais eutanasiados após 14 dias (D14), a dinâmica da área da lesão demonstrou uma diferenciação mais acentuada. Os grupos CON14 e LBP14 foram estatisticamente semelhantes entre si ($p=0,798$), porém, apresentaram diferenças significativas em relação aos demais grupos ($p<0,05$), que, por sua vez, foram estatisticamente semelhantes. Este achado é particularmente relevante, pois os grupos SER14, SUL+LBP14 e SER+LBP14 apresentaram uma redução da área da lesão, convergindo para uma performance superior em relação ao controle e ao LBP isolado. Temporalmente, a AV0 diferiu significativamente de todas as demais avaliações ($p<0,01$), enquanto as avaliações de AV1 a AV5 não apresentaram diferenças estatísticas ($p>0,05$). No entanto, a última avaliação, AV6, foi estatisticamente diferente de todas as outras ($p<0,05$), indicando uma

progressão significativa na resolução da lesão ao final do período de 14 dias. A ausência de interação entre grupos e tempos de avaliação para a área da lesão sugere que os efeitos dos tratamentos foram consistentes ao longo do tempo, sem modulações complexas de suas performances em diferentes momentos.

Em síntese, a análise integrada dos resultados moleculares, histológicos e macroscópicos, dos períodos de 7 e 14 dias pós-queimadura, ilustra a intrincada modulação dos processos inflamatórios, oxidativos e de reparação tecidual pelos tratamentos propostos. Enquanto a fase de 7 dias se caracteriza por uma resposta inflamatória aguda e o início da formação do tecido de granulação, com uma área da lesão ainda em platô e homogeneidade entre os grupos, a fase de 14 dias revela uma diferenciação acentuada e um avanço significativo no processo de cicatrização.

Os grupos tratados, particularmente aqueles com fotobiomodulação (LBP) isolada ou combinada (SUL+LBP e SER+LBP), demonstraram superioridade na modulação do microambiente celular. A redução significativa dos níveis de TNF- α e TBARS aos 14 dias, aliada à diminuição das enzimas antioxidantes SOD e CAT e à tendência de aumento de Nrf2, indica uma supressão da inflamação e um reforço das defesas antioxidantes endógenas. Concomitantemente, a redução da HSP70, de Bax e da Caspase Clivada aponta para uma atenuação do estresse celular e da morte celular programada, crucial para a preservação tecidual.

Essa modulação molecular e celular é convertida em benefícios macroscópicos e histológicos tangíveis. A melhoria na matriz extracelular, especialmente o colágeno Tipo I, nos grupos tratados aos 14 dias, reflete um reparo de maior qualidade. Por fim, a observação de uma redução na área da lesão mais acentuada nos grupos mais responsivos aos 14 dias corrobora a eficácia desses tratamentos na promoção de uma cicatrização mais eficiente. A intrínseca interconectividade entre a inflamação, o estresse oxidativo e a morte celular tornou-se evidenciada pelos resultados. Os tratamentos, individualmente e em combinação, não apenas atuam em alvos específicos, mas também influenciam uma rede complexa de eventos que culminam em uma cicatrização mais acelerada e com melhor prognóstico tecidual. A sinergia entre a fotobiomodulação, a sulfadiazina e a sericina emerge como um diferencial, otimizando a resposta biológica ao trauma térmico.

Ao longo do desenvolvimento desta pesquisa, foram encontradas algumas limitações, como a impossibilidade de analisar as fases de remodelamento e resolução cicatricial das lesões em um momento mais tardio, a fim de, assim, verificar a resistência tênsil e elasticidade da pele, bem como o aspecto estético final dessa cicatriz. Dessa maneira, portanto, são necessários novos estudos, para investigar a reparação tecidual em queimaduras experimentais de segundo grau em mais longo prazo.

7. CONCLUSÃO

Dessa forma, o presente estudo demonstrou que a combinação do creme de sericina com a fotobiomodulação por laser de baixa potência pode constituir uma estratégia eficaz para o tratamento de queimaduras, uma vez que promove um processo de cicatrização semelhante ao obtido com o tratamento padrão-ouro, a sulfadiazina de prata. Esse efeito está relacionado à capacidade desse tratamento em modular a resposta inflamatória, reduzir o estresse oxidativo e otimizar a qualidade do tecido cicatricial.

No entanto, futuras pesquisas são necessárias para aprofundar a compreensão dos mecanismos de ação envolvidos na reparação tecidual de lesões por queimadura, seja por meio de análises adicionais ou pela ampliação do período experimental.

8. ORGANIZAÇÃO DOS MANUSCRITOS REFERENTES À TESE

8.1 ARTIGO I

Revisão sistemática com meta-análise.

Análises

Risco de viés:

- SYRCLE (*Systematic Review Centre for Laboratory Animal Experimentation*)

Meta-análise:

- Média e desvio padrão;
- Intervenção;
- Desfecho.

Situação das análises: concluídas.

Situação do manuscrito: publicado. (Apêndice I).

Revista a que foi submetido: *Photobiomodulation, Photomedicine, and Laser Surgery*

8.2 ARTIGO II

Artigo original.

Análises

Histomorfometria

Termografia

Perfil inflamatório

Sistema antioxidante

Situação das análises: concluídas.

Situação do manuscrito: em revisão (Apêndice II).

Revista a que foi submetido: Wound Repair and Regeneration.

9. REFERÊNCIAS

- ABDULLAHI, A.; AMINI-NIK, S.; JESCHKE, M. G. **Animal models in burn research**. [S. l.]: Birkhauser Verlag AG, 2014a.
- ABDULLAHI, A.; AMINI-NIK, S.; JESCHKE, M. G. Animal models in burn research. **Cellular and Molecular Life Sciences**, [s. l.], v. 71, n. 17, p. 3241–3255, 2014b.
- ARAMWIT, P. *et al.* Monitoring of inflammatory mediators induced by silk sericin. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, [s. l.], v. 107, n. 5, p. 556–561, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2008.12.012>.
- ARAMWIT, P. *et al.* Silk sericin ameliorates wound healing and its clinical efficacy in burn wounds. **Archives of Dermatological Research**, [s. l.], v. 305, n. 7, p. 585–594, 2013.
- ARAMWIT, P. *et al.* The effect of sericin from various extraction methods on cell viability and collagen production. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 11, n. 5, p. 2200–2211, 2010.
- AVCI, P. *et al.* **Low-level laser (light) therapy (LLLT) in skin: stimulating, healing, restoring** *Semin Cutan Med Surg*. [S. l.: s. n.], 2013.
- BARI, E. *et al.* **Association of silk sericin and platelet lysate: Premises for the formulation of wound healing active medications**. [S. l.]: Elsevier B.V., 2018.
- BOLDEANU, L. *et al.* Immunological approaches and therapy in burns (Review). **Experimental and Therapeutic Medicine**, [s. l.], p. 2361–2367, 2020.
- BRASSOLATTI, P. *et al.* Comparative effects of two different doses of low-level laser therapy on wound healing third-degree burns in rats. **Microscopy Research and Technique**, [s. l.], v. 79, n. 4, p. 313–320, 2016.
- CARRIÈRE, M. E. *et al.* Validity of thermography for measuring burn wound healing potential. **Wound Repair and Regeneration**, [s. l.], v. 28, n. 3, p. 347–354, 2020.
- CRISTINA, N.; SANTOS, M. **Anatomia e Fisiologia Humana**. [S. l.: s. n.], 2014. Disponível em: www.shutterstock.com.
- DASH, R. *et al.* Silk sericin protein of tropical tasar silkworm inhibits UVB-induced apoptosis in human skin keratinocytes. **Molecular and Cellular Biochemistry**, [s. l.], v. 311, n. 1–2, p. 111–119, 2008.

DE ANDRADE, A. L. M. *et al.* Effect of photobiomodulation associated with cell therapy in the process of cutaneous regeneration in third degree burns in rats. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, [s. l.], v. 14, n. 5, p. 673–683, 2020.

DE CAMPOS, E. P. *et al.* Healing activity of *Casearia sylvestris* Sw. in second-degree scald burns in rodents. **BMC Research Notes**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 1–8, 2015.

EVERS, L. H.; BHAVSAR, D.; MAILÄNDER, P. The biology of burn injury. **Experimental Dermatology**, [s. l.], v. 19, n. 9, p. 777–783, 2010.

FIÓRIO, F. B. *et al.* Effect of low-level laser therapy on types I and III collagen and inflammatory cells in rats with induced third-degree burns. **Lasers in Medical Science**, [s. l.], v. 29, n. 1, p. 313–319, 2014.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica 12ª Edição**. [S. l.: s. n.], 2011.

HETTIARATCHY, S.; DZIEWULSKI, P. Pathophysiology of burns. **British Medical Journal**, [s. l.], v. 148, n. 384, p. 32–35, 2004.

HEYNEMAN, A. *et al.* **The role of silver sulphadiazine in the conservative treatment of partial thickness burn wounds: A systematic review**. [S. l.]: Elsevier Ltd, 2016.

HUSSAIN, S.; FERGUSON, C. **Silver sulphadiazine cream in burns: Comments**. [S. l.: s. n.], 2006.

JASPERS, M. E. H. *et al.* The FLIR ONE thermal imager for the assessment of burn wounds: Reliability and validity study. **Burns**, [s. l.], v. 43, n. 7, p. 1516–1523, 2017.

JEONG, H. L. *et al.* Effect of a Silk Sericin and Methylsulfonylmethane (MSM) Blends on Inflammatory Response and Wound Healing. **Applied Sciences (Switzerland)**, [s. l.], v. 13, n. 1, 2023.

JESCHKE, M. G. *et al.* Burn injury. **Nature Reviews Disease Primers**, [s. l.], v. 6, n. 1, 2020.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica - 12ª Ed. 2013**. [S. l.: s. n.], 2013-. ISSN 1098-6596.

KEMPF, M.; KIMBLE, R. M.; CUTTLE, L. Cytotoxicity testing of burn wound dressings, ointments and creams: A method using polycarbonate cell culture inserts on a cell culture system. **Burns**, [s. l.], v. 37, n. 6, p. 994–1000, 2011.

KESAVARDHANA, S.; SUBBARAO MALIREDDI, R. K.; KANNEGANTI, T.-D. Annual Review of Immunology Caspases in Cell Death, Inflammation, and

Pyroptosis. [s. l.], v. 57, p. 47, 2025. Disponível em:
<https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-073119->.

KESHRI, G. K. *et al.* Photobiomodulation effects of pulsed-NIR laser (810 nm) and LED (808 ± 3 nm) with identical treatment regimen on burn wound healing: A quantitative label-free global proteomic approach. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, [s. l.], v. 6, 2021.

KHAN, I. *et al.* Accelerated burn wound healing with photobiomodulation therapy involves activation of endogenous latent TGF-β1. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 11, n. 1, 2021.

KHOSROSHAHI, A. F. *et al.* Skin Burns : Review of Molecular Mechanisms AT PL. **Wounds**, [s. l.], v. 31, n. 12, p. 308–315, 2019.

KIERSZENBAUM, A. L. **Histology and cell biology : an introduction to pathology**. [S. l.]: Mosby Elsevier, 2007.

KUMAR, V. *et al.* **Robbins & Cotran Patologia-Bases Patológicas das Doenças 9ª EDIÇÃO**. [S. l.: s. n.], 2016.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. **Robbins. Patologia Básica Patologia Basica**. [S. l.: s. n.], 2013.

KUNZ, R. I. *et al.* Silkworm Sericin: Properties and Biomedical Applications. **BioMed Research International**, [s. l.], v. 2016, 2016.

LAMARO-CARDOSO, A. *et al.* Photobiomodulation associated to cellular therapy improve wound healing of experimental full thickness burn wounds in rats. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, [s. l.], v. 194, p. 174–182, 2019.

LAMBONI, L. *et al.* **Silk sericin: A versatile material for tissue engineering and drug delivery**. [S. l.]: Elsevier Inc., 2015.

LEE, C. H. *et al.* Heat shock protein 70 protects the lungs from hyperoxic injury in a neonatal rat model of bronchopulmonary dysplasia. **Plos One**, [s. l.], v. 18, n. 5 May, 2023.

LIU, J. *et al.* **Picrosirius-Polarization Method for Collagen Fiber Detection in Tendons: A Mini-Review**. [S. l.]: Sociedade Brasileira de Matematica Aplicada e Computacional, 2021.

MANUAL DE ANESTESIA E ANALGESIA DO BIOTÉRIO DA UNIFAL-MG 1- ANESTESIA EM ANIMAIS DE LABORATÓRIO. . [S. l.: s. n.], [s. d.].

MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase. **European Journal of Biochemistry**, [s. l.], v. 47, n. 3, p. 469–474, 1974.

MERTIN, V. *et al.* Current understanding of thermo(dys)regulation in severe burn injury and the pathophysiological influence of hypermetabolism, adrenergic stress and hypothalamic regulation—a systematic review. **Burns and Trauma**, [s. l.], v. 10, 2022.

MOSCA, R. C. *et al.* **Photobiomodulation Therapy for Wound Care: A Potent, Noninvasive, Photoceutical Approach**. [S. l.: s. n.], 2019. Disponível em: <http://cme.lww.com>. .

NIELSON, C. B. *et al.* Burns: Pathophysiology of Systemic Complications and Current Management. **Journal of Burn Care and Research**, [s. l.], v. 38, n. 1, p. e469–e481, 2017.

NÍMIA, H. H. *et al.* Comparative study of Silver Sulfadiazine with other materials for healing and infection prevention in burns: A systematic review and meta-analysis. **Burns**, [s. l.], v. 45, n. 2, p. 282–292, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.burns.2018.05.014>.

NÚÑEZ, S. C. *et al.* The influence of red laser irradiation timeline on burn healing in rats. **Lasers in Medical Science**, [s. l.], v. 28, n. 2, p. 633–641, 2013.

ORYAN, A.; ALEMZADEH, E.; MOSHIRI, A. Burn wound healing: Present concepts, treatment strategies and future directions. **Journal of Wound Care**, [s. l.], v. 26, n. 1, p. 5–19, 2017.

OTTERÇO, A. N. *et al.* Effect of photobiomodulation (670 nm) associated with vitamin A on the inflammatory phase of wound healing. **Lasers in Medical Science**, [s. l.], v. 33, n. 9, p. 1867–1874, 2018a.

OTTERÇO, A. N. *et al.* Photobiomodulation mechanisms in the kinetics of the wound healing process in rats. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, [s. l.], v. 183, p. 22–29, 2018b.

PADAMWAR, M. N. *et al.* Silk sericin as a moisturizer: an in vivo study. **Journal of Cosmetic Dermatology**, [s. l.], v. 4, n. 4, p. 250–257, 2005.

PARIHAR, A. *et al.* Oxidative stress and anti-oxidative mobilization in burn injury. **Burns**, [s. l.], v. 34, p. 6–17, 2008.

ROWAN, M. P. *et al.* Burn wound healing and treatment: Review and advancements. **Critical Care**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 1–12, 2015a. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/s13054-015-0961-2>.

ROWAN, M. P. *et al.* **Burn wound healing and treatment: Review and advancements**. [S. l.]: BioMed Central Ltd., 2015b.

SEABRA, D. I. *et al.* **ANESTESIA E ANALGESIA DE ANIMAIS UTILIZADOS EM PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS**. [S. l.: s. n.], [s. d.]. Disponível em: www.bioterio.fm.usp.br. .

SILVA, P. **FARMACOLOGIA Oitava edição**. [S. l.: s. n.], 2010. Disponível em: www.editoraguanabara.com.br.

SILVEIRA, P. C. L. *et al.* Effect of Low-Power Laser (LPL) and Light-Emitting Diode (LED) on Inflammatory Response in Burn Wound Healing. **Inflammation**, [s. l.], v. 39, n. 4, p. 1395–1404, 2016.

SONG, H.; WANG, F. PANoptosis: a new insight into the mechanism of ischemia-reperfusion injury. [s. l.], Disponível em: <https://academic.oup.com/burnstrauma/advance-article/doi/10.1093/burnst/tkaf026/8110032>.

SÜNTAR, I. *et al.* **Regulatory role of nrf2 signaling pathway in wound healing process**. [S. l.]: MDPI AG, 2021.

TER HORST, B. *et al.* **Advances in keratinocyte delivery in burn wound care**. [S. l.]: Elsevier B.V., 2018.

TIAN, Z.; CHEN, H.; ZHAO, P. **Compliant immune response of silk-based biomaterials broadens application in wound treatment**. [S. l.]: Frontiers Media SA, 2025.

TIWARI, V. K. Burn wound: How it differs from other wounds. **Indian Journal of Plastic Surgery**, [s. l.], v. 45, n. 2, p. 364–373, 2012.

VASHEGHANI, M. M. *et al.* Effect of low-level laser therapy on mast cells in second-degree burns in rats. **Photomedicine and Laser Surgery**, [s. l.], v. 26, n. 1, p. 1–5, 2008.

YADAV, A. *et al.* Combination of medicinal honey and 904 nm superpulsed laser-mediated photobiomodulation promotes healing and impedes inflammation, pain in full-thickness burn. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, [s. l.], v. 186, p. 152–159, 2018.

YADAV, A. *et al.* Role of 904 nm superpulsed laser-mediated photobiomodulation on nitroxidative stress and redox homeostasis in burn wound healing. **Photodermatology Photoimmunology and Photomedicine**, [s. l.], v. 36, n. 3, p. 208–218, 2020.

YADAV, A. *et al.* Superpulsed 904 nm laser photobiomodulation combined with coenzyme Q10 synergistically augment burn wound healing. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, [s. l.], v. 7, 2021.

YOO, K. *et al.* Serial changes of heat shock protein 70 and interleukin-8 in burn blister fluid. **Annals of Dermatology**, [s. l.], v. 29, n. 2, p. 194–199, 2017.

ZHANG, J. *et al.* Exosomes released from human induced pluripotent stem cells-derived MSCs facilitate cutaneous wound healing by promoting collagen synthesis and angiogenesis. **Journal of Translational Medicine**, [s. l.], v. 13, n. 1, 2015.

ZUO, K. J.; MEDINA, A.; TREDGET, E. E. Important Developments in Burn Care. **Plastic and Reconstructive Surgery**, [s. l.], v. 139, n. 1, p. 120e–138e, 2017.