AÇÃO DA FOTOBIOMODULAÇÃO APLICADA EM MEMBRANA AMNIÓTICA HUMANA

Ana Maria Costa Silva, Emília Angela Lo Schiavo Arisawa, Luciana Barros Sant'Anna

[1]Universidade do Vale do Paraíba/Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Avenida Shishima Hifumi, 2911, Urbanova - 12244-000 - São José dos Campos-SP, Brasil, anamariacostasilva05@gmail, lucianabsa@univap.br

Resumo

A membrana amniótica humana (MAH) possui propriedades regenerativas devido à sua composição rica em colágeno e glicoproteínas. Este estudo avaliou o efeito da fotobiomodulação (FBM) sobre a MAH após criopreservação e em diferentes tempos e doses de irradiação. Foram utilizadas três placentas obtidas de cesarianas eletivas, das quais foram isoladas as MAH e armazenadas em DMEM/glicerol (1:1) a -80 °C por sete dias. Após o descongelamento, as amostras foram irradiadas com laser de baixa intensidade. Em seguida, parte das membranas foi submetida ao ensaio de MTT para determinar a viabilidade celular, enquanto outra parte foi destinada à análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV) para avaliação estrutural. Os resultados demonstraram que a fotobiomodulação não causou alterações significativas na viabilidade celular nem comprometeu a integridade da camada epitelial da MAH. Na camada estromal, observou-se reorganização e compactação dos feixes de colágeno conforme a intensidade do laser. Conclui-se que a FBM preservou a estrutura da membrana e pode influenciar sua matriz extracelular, sendo necessários novos estudos para melhor compreender seus efeitos e aplicações na engenharia tecidual.
Palavras-chave: Membrana Amniótica Humana, Fotobiomodulação, Preservação, Viabilidade celular.

Área do Conhecimento Ciências da saúde.

Introdução

A busca por terapias inovadoras que favoreçam a regeneração tecidual tem despertado interesses no campo de pesquisas. A membrana amniótica humana é uma fina camada(0.02mm a 0,5mm) localizada na região interna da placenta, mantendo contato direto com o líquido amniótico e revestindo a cavidade que envolve o feto. Do ponto de vista biofísico, a MAH apresenta um epitélio apoiado por uma membrana basal bem definida e um estroma avascular composto por colágenos, glicoproteínas e glicosaminoglicanos. Essas características conferem resistência mecânica, elasticidade e permeabilidade controlada, tornando-a um biomaterial natural adequado para implantes e enxertos estimulando a reparação tecidual (Arrizabalaga *et al*., 2022).

No nível celular, a MAH contém células epiteliais amnióticas e células estromais mesenquimais. As células epiteliais amnióticas apresentam marcadores associados à plasticidade e secreção de fatores tróficos, como o fator de crescimento epitelial e fator hepatocitário, responsáveis pela estimulação da proliferação e regeneração tecidual (Insausti, *et al*., 2014). Já as células mesenquimais possuem perfil semelhante ao das células-tronco mesenquimais, capazes de modular respostas inflamatórias e promover reparo tecidual por meio da secreção de citocinas imunomoduladoras e fatores antifibróticos (Abumaree *et al*., 2017).

A fotobiomodulação, uma abordagem inicialmente denominada low-level laser therapy (LLLT), tem se mostrado uma terapia não invasiva de baixa intensidade capaz de modular processos celulares e teciduais por meio da luz em comprimentos de onda específicos, principalmente no espectro vermelho e infravermelho próximo (Cheng *et al*., 2022). A técnica atua interagindo com cromóforos intracelulares, como o citocromo c oxidase, promovendo aumento da produção de ATP, espécies reativas de oxigênio e ativação de vias de sinalização que favorecem o reparo tecidual e a redução da inflamação (Cardoso *et al*., 2022).

Considerando que tanto a MAH quanto a FBM exercem efeitos benéficos sobre o reparo tecidual (Hu *et al*., 2023), estudos passaram a investigar a aplicação associada dessas terapias, sugerindo efeitos

sinérgicos na manutenção da viabilidade celular e na potencialização da reparação tecidual (Sant'anna *et al*., 2011; Sant'anna *et al*., 2016; Zhang *et al*., 2023). Entretanto, os mecanismos envolvidos nessa associação ainda não estão totalmente esclarecidos, assim como os efeitos da FBM sobre a integridade estrutural da MAH, especialmente nas células epiteliais e estromais amnióticas. Nesse contexto, o presente estudo tem como objetivo avaliar os efeitos da fotobiomodulação sobre a MAH criopreservada, por meio da análise da viabilidade celular utilizando o método de MTT e da avaliação da integridade estrutural da membrana por MEV.

Metodologia

Após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (protocolo nº 8.331.212), foram obtidas três placentas humanas a termo, com idade gestacional igual ou superior a 39 semanas, provenientes de cesarianas eletivas de pacientes com gestação normal, realizadas no Hospital Santa Casa de São José dos Campos e no Hospital Municipal Dr. José de Carvalho Florence. A obtenção ocorreu após consentimento prévio das parturientes, mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), e após confirmação da ausência de histórico de Covid-19 e sintomas gripais nos 14 dias anteriores à cesárea, assim como resultados negativos para HIV 1 e 2, hepatites B e C e sífilis.

Imediatamente após o parto, as placentas e membranas amnióticas foram acondicionadas em recipientes estéreis, mantidas sob refrigeração entre 10 °C e 15 °C e transportadas ao laboratório de pesquisa pelo pesquisador responsável. Em condições assépticas, foi realizada a separação manual da membrana amniótica (MA) do córion materno. Em seguida, a membrana foi lavada com solução tampão fosfato (PBS) suplementada com antibióticos e antifúngicos (penicilina 100 U/mL, estreptomicina 100 µg/mL e anfotericina B). Após este processamento, os fragmentos de membrana foram imersos em meio DMEM/glicerol na proporção de 1:1 (v/v) e armazenados a -80 °C por sete dias. Posteriormente, as amostras foram incubadas em placas de petri para aplicação da fotobiomodulação (FBM) em diferentes tempos (10s, 30s e 90s) e doses de irradiação (1J, 3J e 9J).

Para a análise da viabilidade celular pelo ensaio colorimétrico MTT, foram utilizados doze fragmentos circulares de 1,5 × 1,5 cm por placenta, sendo três fragmentos destinados ao grupo controle (sem irradiação) e nove fragmentos distribuídos entre os grupos irradiados: Grupo 1J (n=3) – irradiação por 10s; Grupo 3J (n=3) – irradiação por 30s; Grupo 9J (n=3) - irradiação por 90s. Após a irradiação, os fragmentos foram incubados por 2 h com solução de MTT/DMEM (1 mg/mL) a 37°C e 5% de CO2. Em seguida, os fragmentos foram lavados 3 vezes em PBS1x, e os cristais de formazan foram solubilizados com DMSO e agitados durante 20 min.

Para a análise estrutural por microscopia eletrônica de varredura (MEV), foram utilizados quatro fragmentos de membrana amniótica de 3 × 3 cm por placenta, sendo um fragmento destinado ao grupo controle e três fragmentos distribuídos entre os grupos irradiados: Grupo 1J (n=1) – irradiação por 10s; Grupo 3J (n=1) – irradiação por 30s; e Grupo 9J (n=1) – irradiação por 90s.

Após a irradiação, os fragmentos foram lavados em PBS1x, fixados em solução de glutaraldeído a 2,5% e paraformaldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,005M por 2h, desidratados em álcool (30%, 50%, 70% e 100%), secos quimicamente com uma solução de Hexametildissilazano e álcool absoluto por 5 minutos e mantidos em placa de 24 poços a temperatura ambiente para a secagem total. Após a secagem, os fragmentos foram colocados em um porta amostras e metalizados com ouro, utilizando o metalizador Emitech modelo K550X. A análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foi realizada utilizando o equipamento modelo EVO MA 10 (Zeiss).

As amostras de MAH foram submetidas à fotobiomodulação utilizando o equipamento Therapy EC (DMC Equipamentos, SP, Brasil), com comprimento de onda na faixa do vermelho. Os fragmentos pertencentes aos grupos irradiados receberam a aplicação da fototerapia nos tempos experimentais previamente estabelecidos, com incidência perpendicular da luz em m único ponto de aplicação. A tabela 1 detalha os parâmetros para a FBM.

Tabela 1- Descrição detalhada dos parâmetros adotados para a aplicação da terapia por fotobiomodulação

PARÂMETROS	LASER (DMC, modelo Therapy EC)
Densidade de energia (J/cm²)	35,7; 107,14; 357,0
Potência (Mw)	100
Comprimento de onda (nm)	660 (Vermelho)
Área do feixe (cm^2)	0,028 cm^2
Tempo por ponto irradiado (s)	10, 30, 90
Número de pontos	1
Modo de emissão	Continuo
Forma de irradiação	sem contato
Energia total (J)	1J, 3J, 9J

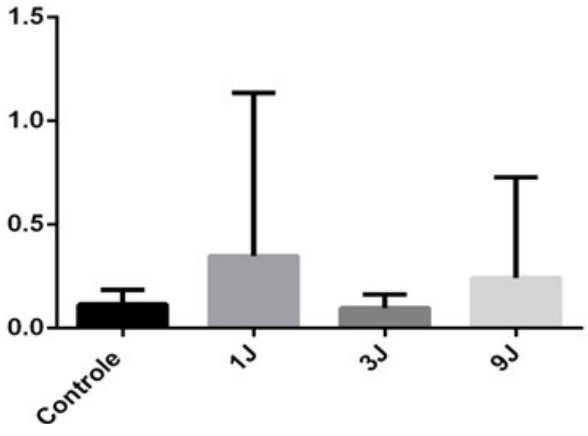
Fonte: autor, 2026

Para a avaliação estatística dos dados, foi realizado inicialmente o teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Os dados do ensaio de viabilidade celular com distribuição normal foram submetidos ao teste ANOVA seguido do teste post hoc de Tukey, sendo o nível de confiança de 95% ($p<0.05$).

Resultados

Ao analisar a atividade mitocondrial por meio do ensaio MTT (Figura 1) demonstrou-se que os valores médios de absorbância foram de 0,1139 para o grupo Controle, 0,3477 para o grupo 1J, 0,0967 para o grupo 3J e 0,2417 para o grupo 9J. Embora alguns grupos tenham apresentado médias superiores ao controle, foi observada uma grande variação entre as amostras, o que pode ter influenciado os resultados estatísticos obtidos. A análise por ANOVA de uma via não revelou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos estudados ($p = 0,6338$). Da mesma forma, o teste de comparações múltiplas de Tukey não identificou diferenças significativas entre nenhuma das comparações realizadas. Os resultados obtidos por meio do ensaio de MTT mostraram que a aplicação da fotobiomodulação não causou alterações significativas na viabilidade celular da membrana amniótica humana. Dessa forma, não foi observado aumento da atividade celular em relação ao grupo controle, assim como também não foram identificados sinais de redução da viabilidade ou danos celulares provocados pelo tratamento. Esses achados indicam que a fotobiomodulação, nas condições utilizadas neste estudo, não comprometeu a integridade celular da membrana amniótica humana.

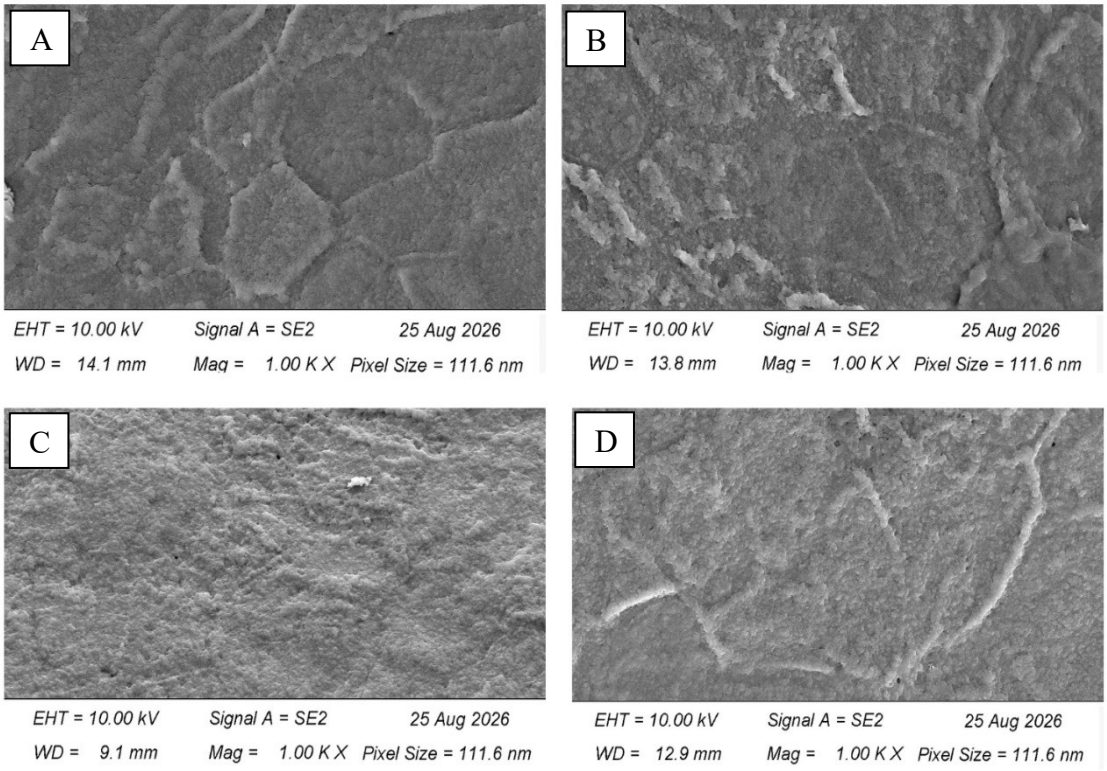
Figura 1: Comparação da viabilidade celular das membranas amnióticas dos grupos controle, 1J, 3J e 9J pelo percentual médio de viabilidade mitocondrial.



Fonte: autor, 2026

A análise da camada epitelial (Figura 2) por microscopia eletrônica de varredura mostrou que as células mantiveram, de modo geral, o seu padrão ultraestrutural característico, incluindo superfície lisa, de aspecto semelhante em toda extensão e caracterizada por células poligonais em padrão mosaico, apresentando contornos e dimensões levemente diferente, mas com junções celulares bem definidas. Estes aspectos indicam que a integridade estrutural da membrana amniótica permaneceu preservada em todos os grupos analisados.

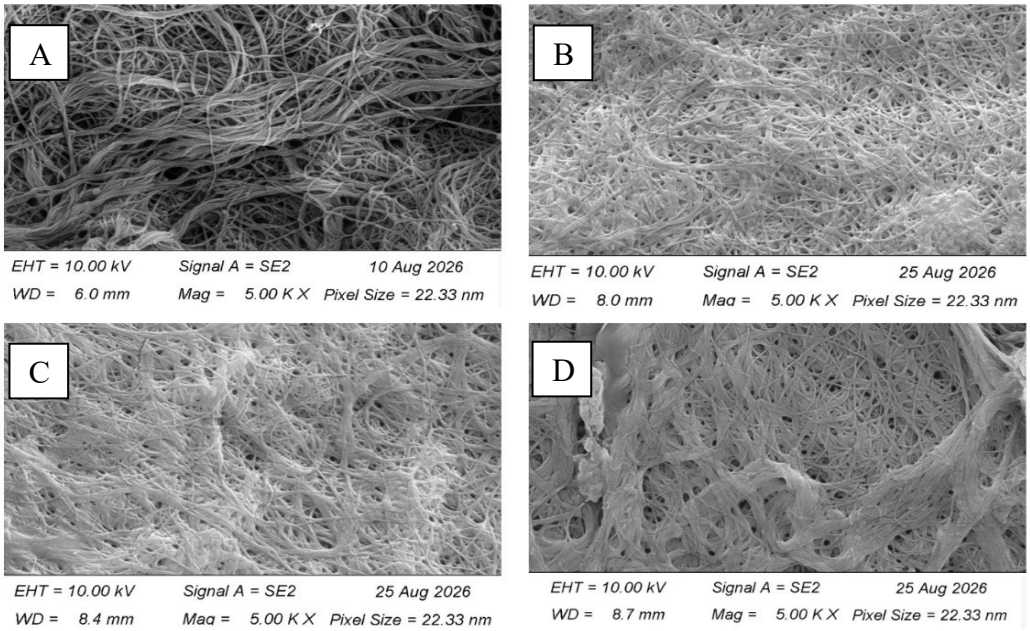
Figura 2: Micrografias eletrônicas representativas da camada epitelial da MAH: A) Grupo controle; B) Grupo 1J; C) Grupo 3J; D) Grupo 9J. Barras de aumento: 10 µm (5000x).



Fonte: autor, 2026

A avaliação morfológica do compartimento estromal (Figura 3) no grupo controle revelou a presença de uma rede de colágeno organizada de forma densa com feixes de fibras de colágeno entrelaçados entre si e de espessuras semelhantes, assim preservando a estrutura normal do tecido. Por outro lado, ao analisar as membranas submetidas à fotobiomodulação, notou-se reorganização da rede de colágeno com compactação na estrutura dessas fibras. Ao invés de entrelaçadas elas estavam aglutinadas formando feixes mais espessos. As amostras irradiadas exibiram uma alteração progressiva dos feixes colágenos, identificando-se um aumento notável na espessura das fibras à medida que se elevava e a intensidade do laser aplicado.

Figura 3: Micrografias eletrônicas representativas da camada estromal da MAH: A) Grupo controle; B) Grupo 1J; C) Grupo 3J; D) Grupo 9J. Barras de aumento: 10 µm (5000x).



Fonte: autor, 2026

Discussão

Neste trabalho, o ensaio MTT e a MEV foram aplicados para avaliar os efeitos da FBM sobre a viabilidade celular e integridade morfológica das camadas epitelial e estromal da MAH criopreservada. Como ainda não existem pesquisas na literatura que detalhem resultados da FBM diretamente sobre a MAH após o uso de diferentes intensidades de laser, este trabalho se caracteriza como um estudo piloto fundamental para mapear as respostas iniciais e guiar pesquisas futuras.

A manutenção da viabilidade celular demonstrada pelo teste de MTT confirma que a aplicação do laser não causou danos às células da MAH, independentemente das doses e tempos de irradiação utilizados. Esses resultados demonstram que a resposta celular ao laser depende dos parâmetros aplicados. De acordo com a tese de Villavicencio (2018), diferentes doses de laser, como 3 J e 5 J, podem causar alterações na composição e estrutura da matriz extracelular. Quando comparado ao presente estudo, esse resultado reforça que diferentes doses podem influenciar a resposta do tecido, mesmo sem alterações significativas na viabilidade celular.

A análise por MEV demonstrou que a camada epitelial manteve, de modo geral, seu padrão morfológico característico. Ademais, não foram observadas alterações como superfície descontínua, desnivelada, rugosa, com perda de células, gaps entre as células ou junções celulares mal definidas que comprometesse a integridade estrutural da membrana. Esses achados podem ser relacionados ao estudo de Moura *et al*. (2023), que destacou a importância da preservação da organização epitelial e da matriz extracelular para a manutenção da integridade da membrana amniótica. Relacionando essa literatura ao presente estudo, os resultados demonstram que a aplicação do laser não provocou alterações destrutivas na camada epitelial. As pequenas modificações observadas podem representar uma resposta morfológica à fotobiomodulação, relacionada a processos de metabolismo e interação celular, porém sem evidências de dano estrutural. Na camada estromal, o grupo controle apresentou aspecto semelhante ao observado por Moura *et al*. (2023), os quais demonstraram que a criopreservação mantém maior integridade da rede de colágeno da MAH. Nas membranas irradiadas, observou-se compactação dos feixes de colágeno e aumento de sua espessura conforme a intensidade do laser. Esses dados sugerem que o laser interagiu com a matriz colágena, podendo ter promovido maior síntese/deposição de colágeno ou a reorganização de fibras pré-existentes. Essas hipóteses são apoiadas por Medrado *et al*. (2008), que observaram fibras mais organizadas e compactas após o laser, e Cunha *et al*. (2019), que demonstraram aumento da deposição e melhor organização do colágeno.

Esses achados reforçam a hipótese de que o laser promoveu a reorganização dos feixes de colágeno da membrana amniótica, embora estudos específicos sejam necessários para confirmar alterações na síntese ou deposição. É importante ressaltar que a rede de colágeno não foi danificada ou degradada, mas apresentou reorganização dos feixes de fibras colágenas. De acordo com Niknejad *et al*. (2008), a membrana amniótica possui propriedades estruturais e mecânicas que favorecem seu uso como *scaffold*. No presente estudo, a preservação do colágeno após a FBM reforça a integridade da camada estromal. Além disso, a variação das fibras conforme a dose sugere que o laser pode influenciar as propriedades físicas da membrana, sendo necessários estudos mecânicos para melhor compreender seu potencial na engenharia tecidual.

Conclusão

Conclui-se que a fotobiomodulação não comprometeu a viabilidade celular nem a integridade da camada epitelial da membrana amniótica humana. As principais alterações foram observadas na camada estromal, com reorganização e compactação dos feixes de colágeno conforme a intensidade do laser. Assim, a FBM pode influenciar a matriz extracelular, sendo necessários estudos futuros para esclarecer seus mecanismos e aplicações na engenharia tecidual.

Referências

ABUMAREE, M. H. et al. Comparison of the proliferation, migration and angiogenic properties of human amniotic epithelial and mesenchymal stem cells. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 8, n. 1, p. 264, 2017.

ARRIZABALAGA, J. H. et al. Amniotic membrane transplantation: structural and biological properties, tissue preparation, application and clinical indications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 24, p. 15519, 2022.

CARDOSO, F. D. et al. Photobiomodulation of Cytochrome c Oxidase by chronic transcranial laser in young and aged brains. **Neurophotonics,** v. 16, p. 818005, 2022.

CHENG, Y. et al. Photobiomodulation therapy at red and near-infrared wavelengths for osteogenic differentiation in scaffold-free microtissues. **Lasers in Medical Science**, v. 38, n. 2, p. 447–458, 2022.

CUNHA, J. L. S et al. Effects of Different Protocols of Low-Level Laser Therapy on Collagen Deposition in Wound Healing. **Brazilian Dental Journal**, v. 30, n. 4, p. 317-324, 2019.

HU, Z. et al. Biological importance of human amniotic membrane in tissue engineering and regenerative medicine. **Materials Today Bio**, v. 22, p. 100790, 2023.

INSAUSTI, Carmen L. et al. Amniotic membrane-derived stem cells: immunomodulatory properties and potential clinical application. **Stem Cells and Cloning: Advances and Applications**, v. 7, p. 53-63, 2014.

MEDRADO, A. P. et al. Influence of laser photobiomodulation upon connective tissue remodeling during wound healing. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 92, n. 3, p. 144-152, 2008.

MOURA, Ana Clara Rezeck. **Efeitos dos métodos de preservação na morfologia das sub-regiões da membrana amniótica humana: estudo por microscopia eletrônica de varredura**. 2023. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2023.

NIKNEJAD, H.et al. Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering. **European Cells and Materials**, v. 15, p. 88-99, 2008.

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

SANT'ANNA, L. B. et al. Antifibrotic effects of human amniotic membrane transplantation in established biliary fibrosis induced in rats. **Cell Transplantation**, v. 25, n. 12, p. 2245-2257, 2016.

ZHANG, R. et al. The mechanisms and efficacy of photobiomodulation therapy for arthrits. A comprehensive review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 18, p. 14293, 2023.

VILLAVICENCIO, Pablo Ruben Garrido. **Tese de doutorado sobre os efeitos da fotobiomodulação sobre a matriz de membrana celular (cell sheet) de células-tronco da polpa dentária humana**. 2018. Tese (Doutorado em Dentistica) – Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.