



ESCOLA BAHIANA DE MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA

FLÁVIA QUADROS LIMA

**AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DE FERIDAS CUTÂNEAS DE RATOS
SUBMETIDAS À TERAPIAS BIOMODULADORAS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**SALVADOR
2023**

FLÁVIA QUADROS LIMA

**AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DE FERIDAS CUTÂNEAS DE RATOS
SUBMETIDAS À TERAPIAS BIOMODULADORAS**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação *stricto sensu* em Medicina e Saúde Humana da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública como requisito parcial à obtenção do título de mestre em medicina e saúde humana.

Orientadora: Profa. Dra. Alena Ribeiro Alves Peixoto Medrado

SALVADOR

2023

Flávia Quadros Lima

“Avaliação histológica de feridas cutâneas de ratos submetidas à terapias biomoduladoras”

Dissertação apresentada à Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Medicina e Saúde Humana.

Salvador, 17 de março de 2023.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Antônio Márcio Teixeira Marchionni
Doutor em Odontologia
Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, EBMSP

Dra. Maria Emília Santos Pereira Ramos
Doutora em Farmacologia
Universidade Estadual de Feira de Santana, UEFS.

Dra. Gabriela Botelho Martins
Doutora em Odontologia
Universidade Federal da Bahia, UFBA.

Eu dedico este trabalho a meus filhos, José Neto e João Manuel e para meus pais Manuel e Rosaly, pelo apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Dr. Antônio Márcio Marchionni por me apresentar ao Grupo de Estudo em Patologia Oral.

À Profa. Dra. Alena Ribeiro Peixoto Medrado pelo cuidado, generosidade, gentileza, carinho e dedicação à minha dissertação e por todo ensinamento sobre a vida e vida acadêmica.

À acadêmica Bruna Lopez pela disponibilidade em contribuir ativamente neste trabalho.

À mestranda Carla Barreto e ao Prof. Paulo Badaró que participaram diretamente da fase laboratorial da pesquisa.

Aos professores da banca examinadora pelas valiosas contribuições feitas à esta pesquisa que enriqueceram e facilitaram sua futura publicação.

Ao Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Medicina e Saúde Humana da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, na pessoa da Profa. Dra. Ana Marice Ladeia, pelo conhecimento adquirido nesses dois anos.

A todos que, direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste estudo.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A utilização de terapias biomoduladoras no intuito de estimular o reparo tecidual tem sido cada vez mais comum nas diversas áreas de Saúde. **OBJETIVOS:** Este estudo objetivou avaliar, comparativamente, os efeitos da fotobiomodulação laser de 660nm, ozonioterapia e óleo ozonizado sobre o reparo tecidual, através da análise histológica em feridas cutâneas de ratos. **METODOLOGIA:** Foram utilizados 40 ratos Wistar alocados randomicamente em 4 grupos de 10 animais cada, Grupo controle (GC), Laser (GL), Gás Ozônio (GGO) e Óleo Ozonizado (GOO). Foram realizados ferimentos cutâneos padronizados no dorso dos animais e os diferentes grupos experimentais foram tratados com as terapias biomoduladoras descritas por três dias consecutivos. Cinco e dez dias após a realização da cirurgia, 5 ratos de cada grupo foram eutanasiados. Foram removidos fragmentos de pele incluindo a área da ferida para processamento histológico e posterior coloração das secções histológicas com Hematoxilina-eosina e Sírius vermelho. Foram obtidas 05 micrografias padrão de cada secção histológica para avaliação semiquantitativa do tipo e intensidade da inflamação, da expressão do colágeno e densidade vascular. Foi realizada análise estatística das variáveis do estudo, com nível de significância $p < 0,05$. **RESULTADOS:** No 5º dia após a cirurgia cutânea, constatou-se que a intensidade da inflamação foi significativamente menor no grupo GL ($p=0,033$). Neste mesmo período, a neocolagênese foi maior no GL ($p=0,012$) quando comparado ao controle. A densidade vascular foi maior no GOO em relação aos outros grupos experimentais ($p=0,045$), em ambos os períodos do estudo. **CONCLUSÃO:** As terapias utilizadas no presente estudo biomodularam diferentes variáveis do reparo cutâneo a depender do período de análise do estudo.

Palavras-chave: Cicatrização; Terapia a laser; Ozonioterapia; Ratos Wistar.

ABSTRACT

INTRODUCTION: The use of biomodulatory therapies in order to assist tissue repair has been increasingly common in various health areas. **OBJECTIVES:** This study aimed to evaluate the effects of 660 nm laser photobiomodulation (PBM), ozone therapy and ozonized oil on repair through histological analysis in rat skin wounds comparatively. **METHODS:** Forty Wistar rats were grouped into four (4) groups of 10 animals each, as follows: Control Group (CG); Laser Group (LG); Ozone Gas Group (OGG); and Ozonized Oil Group (OOG). Standardized skin injuries were performed on the back of the animals and the different experimental groups were treated with the biomodulatory therapies described for three consecutive days. Five and ten days after surgery, five (5) rats from each group were euthanized. Skin fragments, including the wound area, were removed for histological processing and subsequent staining of histological sections with Hematoxylin and Eosin (HE) and Sirius Red Stain. Histological sections were photographed and five standard images were captured. The variables type of inflammation, degree of inflammation, collagen and vessels were analyzed semiquantitatively. Statistical analysis of the study variables was performed, with a significance level of $p < 0.05$. **RESULTS:** On the fifth day after skin surgery, it was found that the intensity of inflammation was significantly lower in the LG ($p = 0.033$). During this same period, neocollagenesis was greater in the LG ($p = 0.012$) compared to the control. Vascular density was more significant in the OGG than in the other experimental groups ($p = 0.045$) in both study periods. **CONCLUSION:** The therapies used in the present study biomodulated different variables of skin repair depending on the analysis period of the study.

Keywords: Wound Healing; Laser Therapy; Ozone Therapy; Wistar Rats.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 - Classificação dos mediadores químicos do processo inflamatório com caracterização de sua origem e função.	15
Figura 1 - Critérios definidos para realização de cálculo amostral	30
Figura 2 - Aspecto clínico da lesão cutânea	31
Figura 3 - Aplicação de fotobiomodulação laser em rato Wistar.	32
Figura 4 - Aplicação de gás ozônio em um dos bordos do ferimento cutâneo em rato Wistar.	32
Figura 5 - Linha do tempo da metodologia do estudo	35
Figura 6 - Análise morfológica dos grupos experimentais. Fotomicrografias de secções histológicas (HE) obtidas na objetiva de 40x das regiões dos ferimentos cutâneos padronizados, que ilustram as características histomorfológicas nos grupos com 5 e 10 dias. Nota-se que no 5º dia, os grupos GC (A), GL (C), GGO (E) e GOO (G) evidenciaram aspectos similares com presença de infiltrado inflamatório monomorfonuclear, característico de inflamação crônica difusa com intensidade que variou de moderada e intensa e inúmeros vasos sanguíneos (setas). No período de 10 dias, GC (B), GL (D), GGO (F) e GOO (H) apresentaram características compatíveis com etapas mais avançadas do processo de cicatrização, com inflamação leve e uma área maior de fibroplasia	38
Figura 7 - Análise morfológica dos grupos experimentais. Fotomicrografias de secções histológicas (Sírius vermelho) obtidas na objetiva de 40x das regiões dos ferimentos cutâneos padronizados, que ilustram as características histomorfológicas nos grupos com 5 e 10 dias. Nota-se que no 5º dia, o GC (A) apresentou fibras mais delicadas, frouxamente organizadas e GL (C), GGO (E) e GOO (G), já exibiam fibras colágenas mais espessas e grossas em algumas áreas das secções analisadas. Aos dez dias, o padrão organizacional das fibras colágenas foi semelhante nos grupos GC (B), GGO (F) e GOO (H), à exceção do GL (D) que exibiu fibras espessas, grossas e densamente organizadas	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação entre os tempos estratificados por grupo	37
Tabela 2 - Comparação entre os grupos estratificados por tempo	37

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	DESENVOLVIMENTO	12
2.1	Revisão de Literatura	12
2.1.1	Aspectos gerais do reparo tecidual	12
2.1.2	O uso de terapias biomoduladoras na cicatrização de ferimentos	17
2.1.2.1	<i>Fotobiomodulação LASER</i>	17
2.1.2.2	<i>Ozonioterapia</i>	23
2.2	Proposição	27
2.2.1	Justificativa.....	27
3	OBJETIVOS	28
3.1	Objetivo geral	28
3.2	Objetivos específicos	28
4	MÉTODOS	29
4.1	Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.....	29
4.2	Amostra.....	29
4.3	Procedimentos cirúrgicos e utilização da terapia biomoduladora.....	30
4.4	Eutanásia.....	33
4.5	Processamento histológico	33
4.6	Avaliação histológica.....	33
4.7	Análise estatística	34
5	RESULTADOS.....	36
6	DISCUSSÃO.....	42
7	CONCLUSÃO	49
	REFERÊNCIAS	50
	APÊNDICES.....	56
	ANEXOS	89

1 INTRODUÇÃO

O uso de terapias biomoduladoras na área de saúde que visam ao reparo tecidual com pouco ou nenhum efeito colateral ao paciente tem despertado o interesse de muitas comunidades científicas. A fotobiomodulação laser e o ozônio têm sido investigados com vistas à obtenção de protocolos clínicos padronizados. Tais terapias podem exercer efeitos analgésicos, anti-inflamatórios e bioestimuladores teciduais que contribuem para a melhora do padrão cicatricial de diversos tipos de feridas.^{1,2}

Neste contexto, tem sido relatado na literatura que a fotobiomodulação laser, com comprimento de onda que se situa no espectro de luz visível, pode interferir positivamente no processo cicatricial através do aumento da biossíntese de ATP, proliferação de linfócitos e aumento da atividade funcional e do número de fibroblastos.^{3,4} Tais efeitos são interdependentes do tipo do tecido tratado, da densidade de energia e de potência do laser, e do tempo e intervalos de aplicação delineados para o paciente.⁵

Adicionalmente, tem sido documentado o uso crescente da ozonioterapia. O ozônio é um componente da atmosfera na natureza, caracterizado por possuir uma molécula composta por três átomos de oxigênio e uma forte ação oxidante. Tem uma estrutura molecular variável de alta energia sob temperatura normal e é decomposto de forma rápida e espontânea em O₂ e um átomo de oxigênio.⁶ Durante este processo, chamado de ozonólise, há a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) que participam de reações de oxi-redução. A ozonioterapia possui ação terapêutica sobre os tecidos animais, pois ativa os mecanismos de síntese protéica e aumenta a quantidade de ribossomos e a atividade mitocondrial nas células. Essas mudanças no nível celular explicam a elevação da atividade funcional e o potencial de regeneração de tecidos e órgãos.⁷

A despeito da utilização das terapias biomoduladoras já citadas, o estudo comparativo dos efeitos da fotobiomodulação laser e ozonioterapia no reparo tecidual tem sido pouco explorado na literatura. Em particular, os poucos estudos que contemplaram o uso destas modalidades terapêuticas para fins de biomodular e/ou acelerar o processo cicatricial demonstraram seus efeitos positivos em diferentes tecidos.⁷⁻¹¹

Diante do exposto, urge a necessidade de se investigar comparativamente algumas variáveis histológicas do reparo tecidual para que se possa ratificar o potencial terapêutico destas terapias biomoduladoras e dessa forma, ampliar a compreensão acerca de seus mecanismos de ação, quer isoladamente ou em conjunto.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão de Literatura

2.1.1 Aspectos gerais do reparo tecidual

O reparo de feridas é descrito classicamente em quatro fases representadas por hemostasia, inflamação, proliferação e remodelamento, que se sobrepõem e resultam em alterações morfofisiológicas teciduais.¹²

De forma sucinta, o reparo se inicia imediatamente após uma lesão tecidual. Os vasos sanguíneos danificados se contraem rapidamente e o coágulo se forma, impedindo a exsanguinação por dano vascular. A primeira etapa da cicatrização fisiológica ou aguda da ferida compreende a hemostasia e a formação de uma matriz provisória, que ocorre imediatamente após a ferida e se completa após algumas horas. Além disso, nesta fase se inicia o processo inflamatório. Às vezes, também é descrita como a fase 'lag', na qual o organismo passa a gerenciar o recrutamento de muitas células para o processo de cicatrização na ausência da resistência mecânica da ferida.¹³ Os neutrófilos, que migram cedo após a lesão, são recrutados para a ferida a partir de estímulos oriundos de células endoteliais além de serem atraídos por agentes quimiotáticos, como a interleucina 1 (IL-1), o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e endotoxinas bacterianas.¹⁴ As diferentes vias da cascata de coagulação são então iniciadas pela clivagem proteolítica dos fatores de coagulação, e os trombócitos são ativados para agregação pelo colágeno exposto. Ao mesmo tempo, os vasos lesionados apresentam uma rápida vasoconstrição de 5 a 10 minutos, desencadeada pelas plaquetas, para reduzir a perda de sangue e preencher a lacuna tecidual com um coágulo sanguíneo, em resposta aos estímulos provenientes de citocinas e fatores de crescimento.¹⁵ O coágulo sanguíneo contém moléculas de fibrina, fibronectina, vitronectina e trombospondina, e forma a matriz provisória como estrutura de suporte para a migração de leucócitos, queratinócitos, fibroblastos e células endoteliais, assim como reservatório de fatores de crescimento.¹⁴

A fase inflamatória aguda, de caráter inespecífico e integrante dos mecanismos da resposta imune inata, é caracterizada por fenômenos exsudativos representados essencialmente por três componentes principais: dilatação de pequenos vasos, o que viabiliza um significativo aumento no fluxo sanguíneo; aumento da permeabilidade da rede microvascular, com consequente

extravasamento de proteínas plasmáticas e transmigração de leucócitos; e intensificação da diapedese dos leucócitos da microcirculação, que se acumulam no foco da lesão e são ativados a fim de eliminar o agente agressor.¹⁶ Tais alterações vasculares da fase aguda são determinantes para o combate ao agente agressor.

O exsudato é um líquido extravascular que contém alta concentração de proteína e detritos celulares. Sua presença no tecido é resultante do já descrito aumento na permeabilidade de pequenos vasos sanguíneos. Integrantes adicionais deste líquido inflamatório, os leucócitos desempenham a função-chave de eliminar os agentes agressores, particularmente através de indução de lesão tecidual provocada pela liberação de enzimas proteolíticas e espécies reativas de oxigênio (EROs).¹⁷ Adicionalmente, são capazes de realizar fagocitose. Entre os leucócitos polimorfonucleares, os neutrófilos representam o grupo celular que migra de forma mais significativa na fase inicial do processo. À medida que o reparo tecidual avança do ponto de vista temporal, tais células vão sendo gradualmente substituídas pelo infiltrado inflamatório monomorfonuclear, com destaque para os monócitos que, no interstício, se diferenciarão em macrófagos. Tais células regulam de forma coordenada as fases exsudativa e proliferativa da cicatrização. Neste contexto, a polarização de macrófagos refere-se ao desenvolvimento de dois fenótipos específicos diferentes (M1 e M2) em resposta a estímulos ambientais locais. Macrófagos ativados classicamente (M1) promovem inflamação na fase inicial da cicatrização de feridas, ao passo que macrófagos ativados alternativamente (M2) exibem função anti-inflamatória na fase tardia do processo.^{18,19}

A natureza do infiltrado leucocitário varia conforme o tempo da resposta inflamatória e o tipo, intensidade e duração do estímulo. De forma geral, há predominância de neutrófilos no infiltrado inflamatório durante as primeiras 6 a 24 horas, ao passo que os macrófagos se tornam mais representativos na transição para a fase crônica que se inicia a partir de 24 a 48 horas. Após migrarem para o tecido, os neutrófilos induzem autólise, heterólise e/ou apoptose e diminuem em número. Os macrófagos não apenas sobrevivem por mais tempo, como também podem proliferar nos tecidos, e é por esta razão que se tornam a população predominante nas reações inflamatórias prolongadas.²⁰

A fase proliferativa da cicatrização é caracterizada por extensa ativação e proliferação de queratinócitos, fibroblastos e miofibroblastos, macrófagos e células endoteliais, que em conjunto, determinam a repitelização, contração da ferida, neocolagênese, elastogênese e

angiogênese. Estima-se que, cerca de 12 horas após o estabelecimento da lesão, os queratinócitos são ativados por mudanças na tensão mecânica de seu citoesqueleto e gradientes eletroquímicos, assim como pela exposição ao peróxido de hidrogênio, fatores de crescimento e citocinas diversas. Essa ativação faz com que os queratinócitos nas bordas do ferimento sofram uma transição epitélio-mesenquimal parcial e desenvolvam um fenótipo mais invasivo e migratório.²¹

Durante a evolução da fase proliferativa, o TGF- β liberado pelas plaquetas, macrófagos e linfócitos T é considerado um sinal de controle mestre que regula uma série de funções de fibroblastos. Sua ação aumenta a transcrição dos genes para colágeno, proteoglicanos e fibronectina e dessa forma, contribui para o aumento da produção geral de proteínas da matriz.²² O TGF- β diminui a secreção de proteases responsáveis pela quebra da matriz e também estimula o inibidor de protease, inibidor tecidual de metaloproteinase (TIMP). Outras citocinas consideradas importantes são as interleucinas, fatores de crescimento de fibroblastos (FGF) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). O processo de reepitelização é estimulado pela presença de EGF (fatores de crescimento epidérmico) e TGF α (fator de crescimento transformador alfa) que são produzidos por macrófagos ativados presentes no leito do ferimento, além de plaquetas e queratinócitos. Nessa etapa do reparo tecidual a célula predominante no local da ferida é o fibroblasto. Essa célula de origem mesenquimal é responsável por produzir a nova matriz necessária para restaurar a estrutura e a função do tecido lesado. Os fibroblastos se ligam aos receptores da matriz provisória de fibrina e começam a produzir colágeno.²³

Os fibroblastos também são o principal tipo de célula responsável pela remodelação da MEC, pois estimulam a substituição do coágulo de fibrina inicial por glicosaminoglicanos, glicoproteínas e proteoglicanos, e sintetizam fibrilas de colágeno. A composição de colágeno da pele adulta não lesionada é de aproximadamente 80% colágeno tipo I e 10% colágeno tipo III. Ocorre uma sequência equilibrada na MEC entre a degradação e a síntese de colágeno, alcançadas através da regulação das metaloproteinases (MMPs).²⁴ Essas collagenases, sintetizadas por macrófagos M2, fibroblastos e queratinócitos, clivam moléculas de colágeno helicoidais nativas durante o reparo. A expressão aumentada de TGF- β e a tensão mecânica estimulam a diferenciação de miofibroblastos que são caracterizados por uma abundância de alfa-actina do músculo liso (α -SMA), associada a uma capacidade de gerar fortes forças contráteis e aderências focais.²⁵

Uma breve caracterização das três classes de mediadores químicos que regulam os eventos relacionados ao reparo tecidual, acha-se descrita no quadro 1.

Quadro 1 - Classificação dos mediadores químicos do processo inflamatório com caracterização de sua origem e função.

Pré-formados em grânulos secretórios		
Mediadores químicos	Origem	Ação biológica
Histamina	Mastócitos, plaquetas e basófilos	Vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, ativação endotelial.
Serotonina	Plaquetas	Vasoconstrição, coagulação sanguínea.
Enzimas lisossômicas	Plaquetas, células endoteliais	Degradação e digestão de substâncias originadas do meio extracelular, autólise e heterólise.
Recém-sintetizadas		
Mediadores químicos	Origem	Ação biológica
IL-1	Macrófagos, células endoteliais, algumas células epiteliais	Estimular a expressão de moléculas de adesão endotelial e secreção de outras citocinas; função preponderante na febre.
TNF	Macrófagos, mastócitos, linfócitos T	Estimular a expressão de moléculas de adesão endotelial e secreção de outras citocinas.
Espécies Reativas do Oxigênio (EROs)	Macrófagos ativados e neutrófilos	Atuam destruindo microrganismos fagocitados e células necróticas. Podem estimular o aumento da expressão de moléculas de adesão e citocinas, amplificando a cascata de mediadores.
Prostaglandinas	Mastócitos, leucócitos	Vasodilatação, dor e febre.
Leucotrienos	Mastócitos, leucócitos	Aumento da permeabilidade vascular, quimiotaxia, adesão e ativação de leucócitos.
Fator de Ativação Plaquetária	Neutrófilos, monócitos, basófilos, células endoteliais e plaquetas	Vasoconstrição e broncoconstrição, além de estimular a produção de outros mediadores químicos.

Quadro 1 - Classificação dos mediadores químicos do processo inflamatório com caracterização de sua origem e função. (Continuação)

Séricos		
Mediadores químicos	Origem	Ação biológica
Sistema complemento	Hepatócitos, macrófagos e células epiteliais do intestino	Estimula a quimiotaxia e a desgranulação dos mastócitos, aumento da permeabilidade vascular, quimiotaxia, opsonização, e induz a migração dos leucócitos para o local da agressão.
Cascata da coagulação	Plaquetas	Protege a lesão vascular e oferece uma matriz provisória através da qual as células podem migrar durante o processo de inflamação. Produz estímulos quimiotáticos para recrutar células inflamatórias circulantes para o local da lesão, iniciando a repitelização e contração do tecido conjuntivo, e angiogênese.
Cascata fibrinolítica	Neutrófilos, monócitos	Regula a geração de plasmina
Cascata das calicreínas	Cininogênio	Aumento na migração de leucócitos e formação do edema tecidual, vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, migração celular, dor e hiperalgesia.

Fonte: Adaptado de Kumar, 2018.²⁶

A fase final do reparo tecidual, representada pelo remodelamento da matriz extracelular (MEC) ocorre concomitantemente aos processos biológicos já citados, mas os eventos biológicos que a caracterizam se intensificam a partir da segunda semana e se estendem até muitos anos após o início da lesão, a depender do tecido afetado. Culmina com a biossíntese de colágeno tipo I, que conferirá maior grau de força tênsil à área da cicatriz. Neste sentido, os fibroblastos e miofibroblastos representam os principais tipos de células responsáveis pelo remodelamento da MEC, pois sintetizam continuamente os constituintes estruturais desta, a exemplo de proteoglicanos, glicoproteínas adesivas e componentes fibrilares. Os proteoglicanos auxiliam

na construção de fibrilas de colágeno maduras e reticuladas e atuam como um substrato para a migração celular.²⁷ Durante o remodelamento, vários membros da família das MMPs clivam um subconjunto específico de proteínas da matriz. Esta ação pode ser regulada positivamente pelos queratinócitos da borda da ferida.¹³

Diante do exposto, pode-se inferir que a cicatrização de feridas é um processo fisiológico altamente coordenado, que restaura rápida e eficientemente a integridade do tecido que sofreu a lesão. É caracterizado pela ocorrência de regeneração e reparo por substituição, a depender do tipo de célula mobilizado pela agressão, bem como da natureza, intensidade e duração do estímulo inicial. Do ponto de vista clínico, o entendimento destes eventos é de grande relevância para os profissionais de saúde uma vez que o manejo de diferentes tipos de feridas está constantemente presente em seu dia a dia. Ademais, a compreensão do reparo tecidual impacta diretamente na escolha da opção terapêutica mais adequada com vistas à otimização deste evento biológico.

2.1.2 O uso de terapias biomoduladoras na cicatrização de ferimentos

2.1.2.1 Fotobiomodulação LASER

A fotobiomodulação (PBM) ou terapia com laser de baixa intensidade (LLLT) surgiu como uma abordagem terapêutica de natureza biofísica, não invasiva e indolor, promissora para promover a aceleração da cicatrização de feridas através da redução da inflamação e dor.²⁸ Desde a sua utilização inicial há mais de 50 anos, tem aumentado o número de evidências científicas acerca do seu potencial de ação nas diferentes fases do reparo tecidual.

Em estudo experimental, desenvolvido em 2008, Medrado et al.²⁹ demonstraram que a utilização da fotobiomodulação laser foi responsável pela regressão do edema e diminuição do número de células inflamatórias no leito de ferimentos cutâneos padronizados em ratos Wistar. Ademais, tais autores relataram que no grupo de animais irradiados com laser de arseneto de gálio e alumínio de 607 nm, com dosimetria de 4 J/cm² por dia de aplicação, houve melhor padrão organizacional e compactação dos feixes de fibras colágenas recém-formadas.

Um estudo experimental desenvolvido por Uzêda-e-Silva et al., (2016)³⁰, avaliou comparativamente os efeitos da fotobiomodulação laser (PBM) em diferentes fases do reparo tecidual em pele de ratos submetidos à dieta hiperlipídica e naqueles com dieta padrão. O

desfecho primário do estudo revelou que a dieta hiperlipídica modificou o padrão do processo inflamatório durante a cicatrização e, como desfecho secundário, foi constatado que a PBM propiciou um efeito biomodulador significativo nos estágios iniciais do reparo, em especial, no sétimo dia após a cirurgia. Resultados semelhantes foram demonstrados por Moreira et al., (2020)³¹ que realizaram um estudo experimental a fim de avaliar os efeitos da fotobiomodulação laser sobre o reparo em pele de ratos em dois períodos distintos representados por 7 e 14 dias. No grupo controle, observou-se maior tempo de permanência da crosta e do infiltrado inflamatório no leito do ferimento em ambos os dias do estudo, ao passo que no grupo tratado com PBM houve completa repitelização dos ferimentos no 14º dia. O grau de neoformação vascular, a contração do ferimento e a expressão de metaloproteinases da matriz (MMPs), em particular a MMP-2, estavam mais elevados nos grupos submetidos à PBM. Os autores sugeriram que estes achados poderiam estar associados ao aumento da atividade mitocondrial com consequente aumento de ATP, vasodilatação, síntese protéica, diminuição dos níveis de prostaglandinas, mitose e migração e proliferação de queratinócitos induzidos pela laserterapia.

O efeito fotobiomodulador da laserterapia tem sido descrito tanto na fase inflamatória quanto nas fases proliferativa e de remodelamento do reparo. Beigom Taheri et al., (2015)³², em outro estudo experimental que abrangeu a realização de ferimento padronizado em pele de ratos, compararam o efeito da fotobiomodulação laser sobre o tecido cutâneo com a ação de um fármaco, a fenitoína. O período de avaliação compreendeu o 3º, o 7º e o 14º dias após a realização do ferimento. Houve significativa diminuição do contingente de células inflamatórias polimorfonucleares no 7º e 14º dias e maior biossíntese de fibras de colágeno no 3º dia no grupo de animais tratados com PBM em comparação com aqueles submetidos ao tratamento com fenitoína. de Medeiros et al., 2017³³ também investigaram os efeitos da PBM na matriz extracelular na fase de remodelamento do reparo cutâneo em ratos. As variáveis do estudo compreenderam a imunexpressão da metaloproteinase MMP-2 e a neoformação vascular, as quais foram analisadas nos dias 7 e 14 após cirurgia. Uma crosta persistente e um número moderado de células inflamatórias foram encontrados nos grupos controle no dia 7 e 14. No grupo laser representado pelo dia 14, as feridas demonstraram repitelização completa. A neoangiogênese e a expressão de MMP-2 foram mais elevadas em grupos tratados com PBM, particularmente no 14º dia. Os autores concluíram que a PBM melhorou a cicatrização de feridas pois aumentou a neocolagênese e a neoangiogênese, e modulou a expressão MMP-2. A superexpressão epidérmica de MMP-2 esteve correlacionada com a proliferação vascular.

Melo et al., 2011³⁴ avaliaram a ação da PBM, com comprimento de onda da ordem de 904 nm, na cicatrização por primeira intenção de feridas cirúrgicas em pele de ratos submetidos à incisão na linha Alba abrangendo epiderme, derme, hipoderme e musculatura abdominal, e suturados continuamente com fios de nylon 5-0. Oito e quinze dias após o procedimento cirúrgico, a área do ferimento foi removida e as secções teciduais foram coradas com Hematoxilina-eosina para avaliar o infiltrado inflamatório, e Tricrômico de Masson e Sírius vermelho, para quantificar as fibras colágenas. Os autores também quantificaram o número de vasos neoformados através da técnica de imuno-histoquímica. Os resultados descritos evidenciaram que os animais tratados com PBM demonstraram significativa modulação da resposta inflamatória, deposição mais organizada de fibras de colágeno e aumento no número médio de vasos recém-formados.

Em 2014, de Melo Rambo et al.³⁵, desenvolveram um estudo que teve como objetivo avaliar e comparar o efeito da PBM na cicatrização de feridas cutâneas de ratos jovens e idosos. Um total de 60 ratos machos compreendendo 30 jovens e 30 idosos foram avaliados. Os animais foram alocados em quatro grupos experimentais e submetidos à cirurgia cutânea e tratamento com PBM (660 nm, 30 mW, 1,07W/cm², 0,028 cm², 72 J/cm²). As análises foram conduzidas para verificar os efeitos da PBM no processo de reparo através da análise da expressão gênica de TNF- α , IL-1 β e IL-10. Os resultados mostraram que houve diferenças significativas entre o grupo controle jovem e o idoso, e entre os grupos tratados. A administração de PBM promoveu uma diminuição estatisticamente significativa na expressão da proteína IL-1 β , em animais tratados quando comparados os grupos controle de ratos jovens e idosos, 3 dias após a lesão. Os autores sugeriram que este resultado ratificou o esperado efeito antiinflamatório da PBM e que o seu uso foi eficaz no tratamento de feridas cutâneas, independentemente da idade dos animais.

A utilização da PBM parece ter um efeito mais eficaz se aplicada em até 24 horas correspondente ao período pós-operatório, segundo salientado por Tabakoglu et al., em 2016.³⁶ Neste estudo, os autores realizaram análise histomorfométrica para avaliar e comparar os efeitos de pulsos de alta potência de 808 nm em feridas cutâneas circulares em ratos, nos grupos irradiados imediatamente após a ferida, e a partir de 24 e 72 horas. A PBM utilizada sob a forma de alta potência e baixa densidade de energia apresentou melhor efeito quando aplicada pela primeira vez, 24 horas após a realização do ferimento. Neste período, observou-se inflamação tardia e proliferação celular inicial, conforme demonstrado pelo aumento no tecido de

granulação, fibroblastos e deposição de colágeno. Os autores concluíram que houve maior taxa de contração da ferida e, portanto, aceleração do reparo.

Além do período ideal para se iniciar o tratamento com PBM, sabe-se que a fluência representa ser outra variável digna de nota. A dosimetria pode variar em relação ao tipo de equipamento utilizado e às características indicadas por seus fabricantes. Contudo, a janela de 1 a 5 J/cm² de fluência tem sido descrita como sendo a mais indicada para o reparo tecidual em diferentes estudos. Neste sentido Suzuki & Takakuda, em 2016³⁷ realizaram um estudo experimental no qual utilizaram diferentes fluências como 0 (controle), 1, 5 ou 10 J/cm², 24 horas após a cirurgia cutânea. Secções histológicas correspondentes à área da ferida foram coletadas no terceiro dia do período pós-operatório para determinar o contingente de macrófagos e no 7º dia, para observar a área da biossíntese de colágeno na área da ferida, através da técnica de microscopia com luz polarizada. Foi constatado que os grupos tratados com diodo semiconductor de 660 nm, com densidades de energia de 1 e 5 J/cm², apresentaram padrão de cicatrização mais favorável em relação ao controle e aos demais grupos com dosimetrias mais altas. Em outro estudo desenvolvido por Solmaz et al., 2017³⁸, o efeito da fotobiomodulação laser de 635 e 809 nm foi avaliado *in vivo* e *in vitro*, através de duas densidades de energia diferentes. Neste estudo, o grupo controle não foi irradiado e os grupos tratados com PBM receberam 1 e 3 J/cm² de fluência, respectivamente. As amostras das feridas do teste *in vivo* foram examinadas no 3º, 5º e 7º dias de cicatrização por meio de testes de resistência mecânica à tração e análise histopatológica. Os resultados do ensaio *in vitro* mostraram que a PBM de 635 nm com ambas as densidades de energia, no período pós-operatório de 24 horas, foi considerada positiva pois induziu um maior índice de proliferação celular com significância estatística. Os resultados da irradiação com laser com 1 J/cm² também evidenciaram efeito significativo na proliferação celular após 72 horas. No entanto, a irradiação com laser de 809 nm, com as diferentes densidades de energia, não demonstrou efeitos positivos e/ou negativos. Dessa forma, os autores concluíram que além da dosimetria e meio ativo do laser, o comprimento de onda representa uma outra variável que deve ser sempre levada em consideração ao se planejar estudos experimentais e/ou ensaios clínicos randomizados.

O efeito biomodulador da PBM na cicatrização de feridas cutâneas pode também ser avaliado por meio de medidas de bioimpedância como demonstrado por Solmaz et al., 2016³⁹. Neste estudo, feridas cutâneas em ratos foram tratadas com laser de diodo de 635 nm com duas densidades de energia da ordem de 1 e 3 J/cm², separadamente. As alterações nas propriedades

elétricas dos locais da ferida foram mensuradas nos dias 3, 7, 10 e 14, após a realização do ferimento. As amostras de tecido foram examinadas histologicamente para determinar a relação entre as propriedades elétricas e a estrutura dos tecidos durante a cicatrização. Nas secções de animais irradiados com laser, observou-se cicatrização mais rápida da lesão. Em particular, os ratos submetidos à menor fluência exibiram resultados significativos nos dias iniciais. No 7º dia de cicatrização, os tecidos irradiados com PBM de 3 J/cm^2 apresentavam áreas de feridas significativamente menores em comparação com feridas não irradiadas.

Tem sido relatado, adicionalmente, a ação da PBM em situações onde tenha ocorrido dano térmico ou queimaduras. Fiório et al., 2014⁴⁰ avaliaram a expressão de colágeno I e III e células inflamatórias em ratos com queimaduras de terceiro grau induzidas experimentalmente. Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais, onde os grupos tratados receberam 3 e 4 J/cm^2 , respectivamente. O sacrifício ocorreu no 8º e 16º dias. Os grupos tratados com PBM evidenciaram uma diminuição estatisticamente significativa do número de células inflamatórias e aumento da deposição de colágeno em comparação com os demais grupos. Outro estudo do mesmo autor, em 2017⁴¹ teve como objetivo avaliar os efeitos da PBM na cicatrização de feridas cutâneas padronizadas em ratos idosos. O estudo incluiu 45 ratos machos, sendo 15 jovens e 30 idosos. Os 45 animais foram distribuídos aleatoriamente em 3 grupos experimentais. Um dos grupos foi tratado com PBM de 660 nm, 30 mW, densidade de potência de $1,07 \text{ W/cm}^2$, e 2 J/cm^2 por via transcutânea. As variáveis colágenos I e III, metaloproteinase 3 e 9 (MMP-3 e MMP-9), inibidor tecidual da metaloproteinase 2 (TIMP-2) e do crescimento fator endotelial vascular (VEGF) foram avaliadas através de estudo imunoistoquímico, ELISA para o fator quimiotático de neutrófilos induzido por citocinas (CINC)-1 e RT-PCR para IL-6. Os autores concluíram que a PBM modulou a expressão de mediadores inflamatórios como IL-6, CINC-1, VEGF, MMP-3, MMP-9 e TIMP-2 de diferentes formas, bem como contribuiu para o aumento da biossíntese de colágeno em animais idosos durante diferentes fases da cicatrização.

As etapas tardias do reparo tecidual também têm sido estudadas sob a ótica da PBM. Fortuna et al., 2018⁴² avaliaram o processo cicatricial 14, 21, 28 e 35 dias após a realização de ferimento cutâneo padronizado. Foi utilizado um laser de arseneto de gálio-alumínio (GaAlAs) (670 nm) para avaliar as variáveis neoangiogênese e fibroplasia em quarenta ratos Wistar machos submetidos à cirurgia cutânea e divididos em 2 grupos experimentais: Grupo Controle e Grupo Laser (9 mW, 670 nm, $0,031 \text{ W/cm}^2$, 4 J/cm^2). A análise qualiquantitativa demonstrou

quantidade de células CD31+ maior no grupo tratado com PBM. Não houve diferença estatisticamente significativa na contagem de células VEGF+ nos diferentes grupos experimentais ao longo do estudo, embora tenha sido demonstrada uma correlação positiva com a área de colágeno nos dias 14 e 28 ($p = 0,037$). O tratamento com PBM teve um efeito positivo no curso tardio da cicatrização, principalmente no que diz respeito à expressão de colágeno e ao número de vasos neoformados.

Entre as mais variadas ações terapêuticas da PBM, destaca-se também a capacidade de reduzir o risco de contaminação de feridas. Silva et al., 2013⁴³ avaliaram o efeito da PBM na taxa de contaminação bacteriana em feridas infectadas na pele de ratos e concluíram que o laser de AlGaInP, com dose de $5\text{J}/\text{cm}^2$ aplicado em 3 dias consecutivos em forma de varredura, tanto em pele íntegra quanto em feridas de ratos infectados com *Staphylococcus aureus* MRSA, demonstrou redução significativa da proliferação bacteriana. O referido estudo experimental utilizou 56 ratos Wistar machos que foram divididos aleatoriamente em oito grupos de sete cada. As amostras foram coletadas antes da inoculação das bactérias e após o tratamento com PBM.

Gonçalves et al., 2010⁴⁴ avaliaram os subtipos de fibras colágenas em um modelo experimental de cicatrização com laser de arseneto de gálio-alumínio (GaAlAs), arseneto de gálio (GaAs) e óleo de girassol em feridas cutâneas em ratos Wistar. As aplicações foram feitas diariamente durante um período de 20 dias. Os fragmentos de tecido foram corados com Picrosirius para distinguir o colágeno tipo I do colágeno tipo III. As fibras de colágeno foram fotodocumentadas e analisadas através de um software baseado no espectro de cores primárias vermelho, amarelo e azul. Resultados significativos para a taxa de fechamento da ferida foram observados nos grupos tratados com PBM. As fibras de colágeno tipo I de dois grupos tratados com laser diferiram significativamente do controle no 20º dia do experimento. Neste estudo, os autores verificaram que uma densidade de energia de $30\text{ J}/\text{cm}^2$ foi mais eficiente em estimular a produção de colágeno tipo I e tipo III, enquanto o uso de $4\text{ J}/\text{cm}^2$ foi mais eficaz na síntese do colágeno tipo I, e principalmente na aceleração da taxa de fechamento da ferida.

Conforme observado na maioria dos estudos citados, o modelo experimental clássico de cicatrização cutânea tem sido amplamente descrito na literatura. Ademais, a análise do processo cicatricial nestes modelos com a utilização da fotobiomodulação laser e outras terapias

biomoduladoras, tem assumido grande relevância para determinar opções terapêuticas que favoreçam e/ou acelerem o reparo.

2.1.2.2 Ozonioterapia

Outra terapia que tem sido bastante utilizada para auxiliar no processo de reparo tecidual é a Ozonioterapia. Sua ação está diretamente ligada à sua capacidade de exercer uma atividade antimicrobiana e imunomoduladora no reparo tecidual. Ele é um composto natural da atmosfera, caracterizado por possuir uma molécula composta por três átomos de oxigênio e uma forte ação oxidante. A Ozonioterapia começou a ser utilizada, na primeira guerra mundial, inicialmente na Alemanha e União soviética e, *a posteriori*, sua prática se disseminou por toda Europa. Sua influência sobre o reparo tecidual tem sido documentada⁴⁵ e sua ação terapêutica é promovida pela ativação de neutrófilos, os quais através de surto oxidativo, inativam diversos tipos de microrganismos. Outro estudo demonstrou que o gás ozônio pode favorecer os mecanismos de síntese protéica pelo hospedeiro, aumento da quantidade e atividade de ribossomos e mitocôndrias nas células, e de oxigênio nos tecidos.⁴⁶

O gás ozônio é constituído por três átomos de oxigênio e é conhecido como O₃. A terapia com ozônio tem demonstrado ser segura para uso nas diversas áreas de saúde devido às suas propriedades antimicrobianas, desinfetantes e curativas.⁴⁷ Pequenas doses de ozônio podem ativar mecanismos bioquímicos, inclusive o sistema antioxidante. Doenças que podem ser tratadas com ozônio incluem feridas infectadas, distúrbios circulatórios, condições geriátricas, degeneração macular, doenças virais, reumatismo/artrite, câncer, entre outras.¹¹

Inicialmente, a ozonioterapia foi utilizada pelas diferentes especialidades na área de saúde como uma alternativa terapêutica sem parâmetros bem definidos. Nos últimos anos, o interesse pelo ozônio por parte de comunidades científicas aumentou consideravelmente e atingiu um novo estágio, haja vista que a maioria dos mecanismos biológicos desencadeados por esta terapia tem sido descrita na literatura.²

Devido à sua fácil absorção pelos tecidos, o ozônio pode ser usado com segurança na Medicina, mesmo que seja liberado no sangue, onde possui uma potente capacidade antioxidante composta por vários compostos lipofílicos, hidrofílicos e uma variedade de enzimas antioxidantes.⁴⁸ Os átomos de oxigênio que compõem a estrutura molecular do ozônio estão

normalmente organizados em uma estrutura cíclica. O equipamento gerador de ozônio produz a partir de oxigênio puro que passa por um gradiente de alta tensão (5–13 mV). O ozônio é um gás instável que não pode ser armazenado e deve ser usado imediatamente, pois tem meia-vida de 40 minutos a 20 °C.⁶ Como o ozônio em si não penetra nas células, mas reage imediatamente com os ácidos graxos insaturados, acredita-se que seus efeitos devem ser resultantes de reação oxidativa.

Segundo Bocci et al., (2016)⁹ as propriedades antimicrobianas do ozônio são determinadas pela sua capacidade em romper diretamente o ácido nucleico ou parede celular constituída por lipossomas de alguns microrganismos. Depois que a membrana é danificada, a sua permeabilidade aumenta e as moléculas de ozônio podem entrar facilmente nas células. O ozônio bloqueia a função enzimática em bactérias oxidando glicoproteínas e glicolipídios. Ao entrar no interior da célula bacteriana, o ozônio oxida os fosfolipídios e lipoproteínas do envelope da célula bacteriana e interrompe a integridade da membrana citosólica.

O ozônio pode ser administrado através de diferentes vias: insuflação retal, via sublingual, auricular, diretamente no tecido e tópica. A sua ação tópica diz respeito primariamente ao uso de veículos como óleos, água e nanopartículas. Tem sido usado por via intravenosa, intramuscular, em cavidades do corpo (reto, bexiga, vagina), articulações, tecido subcutâneo e mole, intraperitoneal e até intratecal. É altamente irritante para os pulmões e não pode ser inalado. O método de administração mais comum em todo o mundo é por gás intravenoso direto (administração intravenosa direta - DIV).⁴⁶

O óleo ozonizado, por exemplo, tem sido descrito como sendo capaz de afetar a permeabilidade da parede celular das células bacterianas, induzida pela perda do conteúdo intracelular do íon K^+ e, leva à redução do conteúdo citoplasmático nas células bacterianas de *S. aureus*. A sua rápida decomposição em radicais livres, que se espalham rapidamente pela célula bacteriana, perturba a atividade celular usual. A terapia com ozônio inibe o crescimento de fungos, danifica os capsídeos virais e interfere no ciclo reprodutivo bacteriano.⁵⁰

Adicionalmente, o uso do ozônio sob a forma de óleo tem sido muito útil para o tratamento da pele, devido à capacidade absorptiva do veículo. Compostos ozonizados descritos como ozonídeos são formados pela reação de olefinas com ozônio. Qualquer olefina pode ser tratada

com ozônio gasoso para formar um ozonídeo. As composições de ozonida têm a capacidade de fornecer oxigênio nascente dentro da lesão sem causar irritação primária no tecido.⁵¹

Os dados, apresentados por Silva et al., em 2020⁵², indicam claramente que os óleos vegetais ozonizados têm efeito nos biofilmes bacterianos, em particular nos biofilmes maduros e nas células aderidas. Os óleos ozonizados podem ser utilizados como alternativa aos antibióticos no tratamento de infecções de pele causadas por bactérias multirresistentes. Ademais, os óleos vegetais apresentam diferentes propriedades físico-químicas, que dependem do comprimento da cadeia carbônica e do grau de insaturação. Para obter um óleo vegetal com a qualidade exigida é necessário mensurar um conjunto de características e atributos sensoriais, físicos e químicos para estabelecer sua eficácia. Sabe-se que quando um óleo vegetal reage com o ozônio forma-se um grupo de compostos oxigenados que conferem efeitos antimicrobianos ao óleo.⁵³ Por esta razão, o uso dos óleos ozonizados tem sido encarado como uma alternativa terapêutica segura nas diversas especialidades médicas, em especial, a cosmetologia.

Os ácidos graxos presentes nos diferentes tipos de óleo podem controlar as funções dos neutrófilos e existem evidências de que os ácidos oleico e linoleico causam alterações marcantes no tecido em cicatrização durante o período inflamatório deste processo. De acordo com Pereira et al., (2008)⁵⁴, tais ácidos graxos exercem efeito pró-inflamatório na cicatrização de feridas cutâneas. Esta conclusão baseou-se no aumento do conteúdo de proteína e DNA que refletiram a celularidade representada pela infiltração de neutrófilos em um estudo experimental com ratos.

O estudo de Valacchi et al., (2011)⁵⁵, avaliou os efeitos terapêuticos de três diferentes tipos de óleo de gergelim ozonizado em feridas cutâneas agudas feitas na pele de camundongos da linhagem SKH1. Especificamente, a taxa de fechamento da ferida, os parâmetros histológicos e o nível de proteínas-chave, como VEGF e ciclina D1, foram analisados em relação ao nível de peróxidos presente no óleo ozonizado. O tratamento com óleo de gergelim moderadamente ozonizado – expresso como valor de peróxido de cerca de 1.500 apresentou uma taxa de fechamento da ferida mais rápida nos primeiros 7 dias do que o tratamento com óleo contendo valor de peróxido menor ou maior, assim como com os controles. Além disso, os autores relataram maior neoangiogênese, bem como um aumento dos fatores de crescimento já citados. De fato, os efeitos benéficos do O₃ na cicatrização de feridas podem ser atribuídos à diminuição

do risco de infecção bacteriana e aumento da tensão de oxigênio no tecido exposto a este composto químico.⁵⁶

Em estudo experimental realizado por Krkil et al., em 2016⁵⁷, os autores testaram a hipótese de que o azeite de oliva ozonizado poderia melhorar a neovascularização mediada por VEGF de retalhos cutâneos de padrão aleatório em ratos. O estudo imunistoquímico foi realizado para analisar as expressões de VEGF e CD34 e evidenciou, no grupo óleo ozonizado que estas foram significativamente maiores do que no grupo óleo também no grupo tratado com óleo puro quando comparado ao controle. Os autores concluíram que tanto o azeite ozonizado quanto o azeite de oliva puro melhoraram a neovascularização quando aplicados topicamente em retalhos de pele, mas o efeito do ozônio foi mais proeminente.

Em seu estudo experimental em modelo de ferida de pele de camundongos, Xiao et al., (2021)⁵⁸ mostraram que a aplicação direta de óleo ozonizado na ferida acelerou o processo de cicatrização. Descobriram que o tratamento aumentou muito as habilidades de proliferação e migração, bem como os níveis de proteína α -SMA e colágeno I dos fibroblastos. Esses resultados comprovam que o óleo ozonizado pode ser usado como uma maneira fácil e eficaz de tratar feridas na pele.

O uso do ozônio vem crescendo nas diversas áreas da saúde. Na Odontologia, a terapia com ozônio tem sido utilizada até agora no manejo de cicatrização de feridas, cárie dentária, líquen plano oral, gengivite e periodontite, halitose, osteonecrose da mandíbula, dor pós-cirúrgica, placa e biofilmes, canais radiculares, hipersensibilidade dentinária, distúrbios da articulação temporomandibular e branqueamento dental.⁵⁹ A terapia pode alterar a história natural de várias doenças e distúrbios; uma infinidade de estudos de laboratório forneceu evidências das capacidades antioxidantes do O₃, bem como modulações vasculares, hematológicas e do sistema imunológico. Esta evidência foi ainda mais fundamentada em ensaios clínicos com O₃ terapêutico sendo útil nas patologias cardiovasculares, do tecido subcutâneo, doenças vasculares periféricas, neurológicas, de cabeça e pescoço, ortopédicas, gastrointestinais e geniturinárias. A ozonioterapia tem se mostrado especialmente benéfica no pé diabético, feridas isquêmicas e doença vascular periférica.⁶⁰

Os resultados de estudos que contemplaram a ozonioterapia em suas diferentes formas de aplicação descritos na literatura até o momento, sugerem fortemente um possível efeito biomodulador desta terapia.

2.2 Proposição

2.2.1 Justificativa

Diante da ocorrência de fatores complicadores do reparo tecidual, a exemplo de contaminação bacteriana, tração mecânica excessiva, imunodeficiências, doenças metabólicas como diabetes mellitus, entre outros, torna-se relevante a geração de conhecimento acerca de métodos alternativos que podem modular positivamente a atividade das células presentes nos tecidos afetados. A verificação da verdadeira eficácia destas terapêuticas que incluem a fotobiomodulação laser e a ozonioterapia é necessária para que o seu uso se torne acessível na prática clínica dos profissionais de saúde, em especial, para pacientes que apresentam dificuldade de cicatrização de ferimentos.

Embora já existam alguns trabalhos na literatura que abordam o potencial de ação das terapias biomoduladoras citadas, a realização de um estudo experimental, controlado, *in vivo*, permitiu compreender melhor as alterações teciduais decorrentes da sua utilização durante o processo de cicatrização de ferimentos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a influência da fotobiomodulação laser e da ozonioterapia, comparativamente, no processo de reparo tecidual de feridas cirúrgicas padronizadas em pele de ratos através de análise histológica.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar, semiquantitativamente, o efeito da fotobiomodulação laser, do óleo ozonizado e do gás ozônio sobre o infiltrado de células inflamatórias mononucleares e o grau da inflamação crônica, em secções de pele de rato coradas com Hematoxilina-eosina;
- Analisar, através de análise semiquantitativa, o padrão de organização das fibras colágenas e a densidade vascular no leito do ferimento, nos diferentes grupos experimentais;
- Comparar as variáveis descritas em dois períodos distintos do processo de reparo cutâneo em ratos submetidos às terapias biomoduladoras.

4 MÉTODOS

4.1 Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

Este estudo foi encaminhado para a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade Adventista da Bahia (FADBA). Foi registrado com o número de protocolo 67/2019. O número do parecer de aprovação pelo CEUA foi CIAEP: 01.0039.2013 (ANEXO 1).

4.2 Amostra

Durante o experimento, os animais foram mantidos na Faculdade Adventista da Bahia (FADBA), em condições sanitárias de biotério convencional desta Instituição. O acondicionamento dos animais foi realizado em gaiolas individuais, etiquetadas, com chão coberto por maravalha. Os ratos foram mantidos em condições padrão de temperatura (22-25° C), umidade relativa (50-52%), com ciclos de luz, escuro por 12 horas, e expostos à luminosidade artificial doze horas por dia. A alimentação dos ratos foi feita com ração balanceada Nuvilab® (Suprilab) e água *ad libitum*. Foram adotados cuidados específicos com relação à limpeza e o ambiente protegido de estímulos auditivos para evitar o estresse.

Foi realizado cálculo amostral para determinar o número de animais necessários para o estudo. Nesse aspecto, foram adotados os critérios estabelecidos por Eckelman et al., (2007) ⁶¹ e Scheibe (2008) ⁶², onde o nível de significância foi de $p < 0,05$, com diferença em % entre o grupo controle e o grupo teste de 30%, e coeficiente de variação (CV) de 20% para ratos Wistar. Desta forma, o número de ratos foi definido com 5 para cada grupo experimental (Figura 1).

Figura 1 - Critérios definidos para realização de cálculo amostral.

Table 1
Animals needed for a statistically significant result

Percent difference between control and treatment group averages	Percent CV due to biological variability	Number of animals	Significance ($P < .05$)
20	20	2-7	Not significant
20	20	8	Significant
20	15	5	Significant
25	20	5	Nearly significant
30	20	5	Significant
25	15	5	Significant

Fonte: Eckelman et al., (2007).

A amostra contemplou 40 animais e foi estabelecido como critérios de inclusão serem ratos machos *Wistar* com peso entre 150-300g provenientes do biotério da Faculdade Adventista da Bahia. Como critérios de exclusão, ficaram fora da amostra, animais que apresentassem feridas, doenças ou defeitos cutâneos. Os animais foram alocados por sorteio do número de registro no biotério, em 4 grupos de 10 ratos cada, os quais foram sacrificados no 5º e 10º dias após o início dos testes. Em cada um desses períodos, 5 ratos de cada grupo experimental foram sacrificados. O Grupo 1 correspondeu ao Grupo Controle (GC) e recebeu aplicação de uma gota de solução salina; o Grupo 2, denominado Grupo Laser (GL), foi submetido à fotobiomodulação laser convencional; o Grupo 3, chamado de Grupo Ozônio (GO), recebeu terapia com ozônio gasoso insuflado na borda da lesão e o Grupo 4, Óleo Ozonizado (GOO) foi tratado com óleo na superfície da lesão.

4.3 Procedimentos cirúrgicos e utilização da terapia biomoduladora

Seguindo os protocolos preconizados para experimentos com animais descrito por Damy et al, (2010)⁶³, os animais foram submetidos à pesagem, anestesiados com cloridrato de quetamina 10% (Dopalen®, São Paulo, Brasil) 75 mg/ml e cloridrato de xilazina 2% (Anazedan, São Paulo, Brasil) 5 mg/ml, com a dosagem de 2mg/kg e 3mg/kg respectivamente. Em seguida, efetuou-se a tricotomia dorsal.

Foi realizada uma incisão circular na região dorsal com o auxílio de um bisturi circular metálico, *punch*, (Biopsy Punch, Stiefel, Alemanha) com 6mm de diâmetro para a obtenção de uma ferida

uniforme e padronizada, a qual foi executada por um único operador devidamente calibrado, de acordo com o modelo descrito por Medrado et al., (2006) ⁶⁴; (Figura 2).

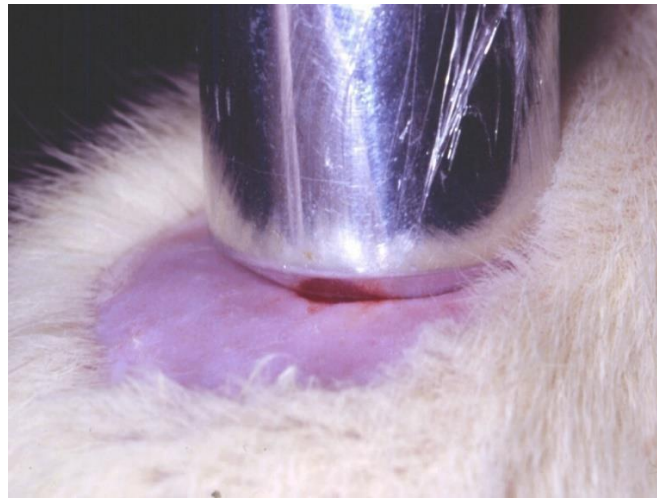
Figura 2 - Aspecto clínico da lesão cutânea



Fonte: Autoria própria.

Os ferimentos cutâneos dos ratos do Grupo Laser (GL) foram submetidos a 4 aplicações pontuais de 1 J/cm^2 , diametralmente opostas nos bordos da ferida com dosimetria total de 4 J/cm^2 , por dia de aplicação. Utilizou-se um aparelho semiconductor de laser de arseneto de alumínio e gálio (AsAlGa , 9 mW, 670 nm, Laser de diodo de $0,031 \text{ W/cm}^2$), com emissão contínua e área da ponta ativa de $0,28 \text{ cm}^2$ (Laser VR-KC-610- Dentoflex, Brasil). A dosimetria final foi de 12 J/cm^2 pois os ratos foram irradiados em 3 dias consecutivos após o procedimento cirúrgico (Figura 3).

Figura 3 - Aplicação de fotobiomodulação laser em rato Wistar.



Fonte: Autoria própria.

O ozônio foi produzido pelo gerador Philozon[®] (Philozon - Indústria e comércio de geradores de ozônio - LTDA, Santa Catarina, Brasil) na concentração de 13 μ g/ml de ozônio, a partir de oxigênio medicinal, com fluxo constante de 1L/min. A mistura com oxigênio foi capturada em uma seringa de 5 ml e, através de uma agulha de insulina, o gás foi insuflado com volume de 1ml, de forma uniforme, em 4 pontos correspondentes aos vértices diametrais na borda da lesão totalizando 52 μ g de O₃. Este procedimento foi repetido por três dias consecutivos, após a cirurgia (Figura 4).

Figura 4 - Aplicação de gás ozônio em um dos bordos do ferimento cutâneo em rato Wistar.



Fonte: Autoria própria.

Foi administrado óleo de girassol ozonizado a 100% (Philozon - Indústria e comércio de geradores de ozônio - LTDA, Santa Catarina, Brasil). Aplicou-se apenas uma gota, com conta-gotas padronizado com volume de 50µl, na superfície da lesão por 3 dias consecutivos nos mesmos moldes dos grupos anteriores.

Os animais foram submetidos às terapias biomoduladoras descritas nos dias 1, 2 e 3 do estudo. O grupo controle recebeu solução salina a 9% com um conta-gotas padrão correspondente a 1 ml na superfície da lesão, por 3 dias consecutivos. Cada grupo com 10 animais teve metade dos espécimes sacrificados no 5º dia e a outra metade no 10º dia.

4.4 Eutanásia

Após sedação profunda com a solução anestésica já descrita, os animais foram alocados em grupos na câmara de gás onde foi liberado gás carbônico em uma concentração de 5 litros por minuto.

4.5 Processamento histológico

Após a confirmação de morte, foi removida uma porção de tecido do dorso dos ratos que compreendia a ferida cirúrgica. O espécime foi fixado por um período mínimo de 18 horas, em solução de formol 10%, tamponado. Os fragmentos de pele contendo a lesão foram submetidos a cortes histológicos de 4 µm de espessura e corados com Hematoxilina-Eosina para avaliação das variáveis infiltrado monomorfonuclear, intensidade da inflamação crônica e densidade vascular. As secções teciduais foram também coradas com Sírius vermelho a fim de analisar a neocolagênese.

4.6 Avaliação histológica

A captura das imagens dos cortes teciduais submetidos às colorações descritas foi realizada através do software Motic Images Advanced 3.0® (Motic China Group CO. LTD) do Laboratório de Bioquímica Oral do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia. Foi estabelecida uma área padrão para análise de todos os casos, a saber, 13107,200000 pixels. Cinco imagens padrão correspondentes a cada secção tecidual foram capturadas com a dimensão estabelecida para análise semiquantativa do infiltrado inflamatório

monomorfonuclear, da densidade vascular e neocolagênese. Essas áreas foram documentadas na região da derme subjacente à localização da úlcera cutânea.

Cada área foi capturada no aumento de 40x e salva em formato JPEG. Todas as análises foram realizadas às cegas, por três examinadores previamente calibrados (ARAPM, FQL, BCLM). O índice de Cohen kappa foi utilizado para avaliação da concordância entre os examinadores e demonstrou resultado de 0,92.

O grau de inflamação no tecido foi aferido e adaptado do estudo de Alvarenga et al., (2020) ⁶⁵. Foi realizado um estudo semiquantitativo das secções que incluiu a análise das variáveis infiltrado inflamatório polimorfo e monomorfonuclear, intensidade da reação inflamatória e densidade vascular. Foram adotados os seguintes critérios no tocante à variável infiltrado inflamatório: grau 1 para inflamação aguda (membrana piogênica); grau 2 para predominância de inflamação aguda difusa; 3 para predominância de processo inflamatório crônico e 4, para indicar resolução completa e cicatrização. Com relação à intensidade da inflamação, considerou-se 1 para grau leve, 2 para moderada, 3 para intensa e 4 muito intensa. A densidade vascular foi categorizada de acordo com os seguintes escores: 1 para até 10 vasos identificados, 2 para 11 a 20 vasos, 3 para 21 a 50 vasos e 4 para número superior ao citado.

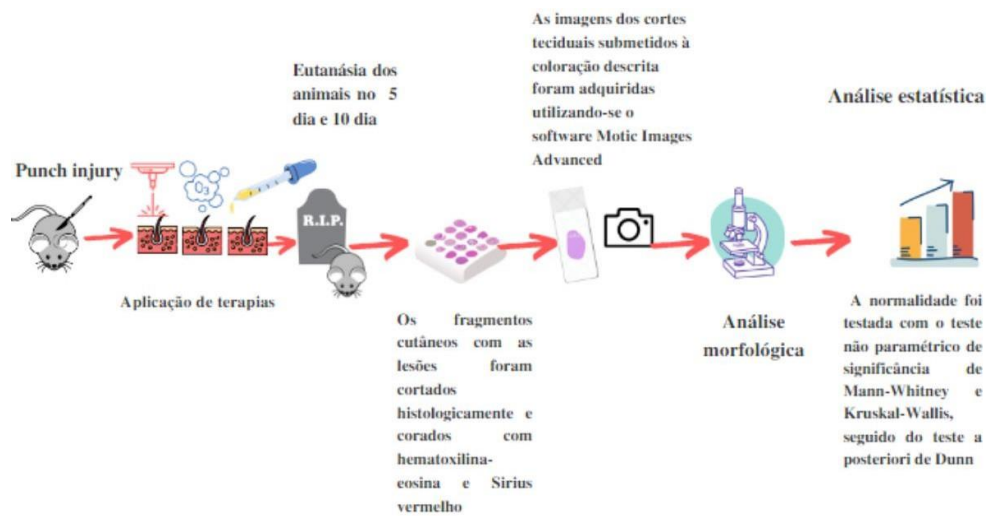
A biossíntese do colágeno foi avaliada também de acordo com os critérios estabelecidos por Alvarenga et al., (2020) ⁶⁵ as fibras colágenas foram classificadas através de três escores: 1 para fibras colágenas finas, delicadas, frouxamente organizadas vistas em toda a área da ferida; 2 para fibras colágenas finas, delicadas frouxamente organizadas em algumas áreas e mais espessas e grossas em outras áreas da ferida e 3 para fibras colágenas espessas, grossas e densamente organizadas vistas em toda a área da ferida.

4.7 Análise estatística

Os dados foram analisados no software R (versão 4.2.0), onde foi realizada a análise descritiva (mediana e quartis) com a finalidade de identificar as características gerais e específicas da amostra estudada. Para verificar a normalidade da distribuição dos dados, utilizou-se o teste de Shapiro-Wilk e análise da simetria e achatamento da curva da distribuição.

Para verificar a existência de diferença significativa entre os grupos de interesse foram utilizados o teste de Mann-Whitney e o de Kruskal-Wallis não-paramétricos, seguidos pelo teste a posteriori de Dunn. O nível de significância estabelecido para este trabalho foi de 5%. A figura 5 ilustra todo o delineamento do estudo experimental realizado.

Figura 5 - Linha do tempo da metodologia do estudo



Fonte: adaptado de Alvarenga et al., (2020).

5 RESULTADOS

A tabela 1 ilustra especificamente a comparação dos dois dias de sacrifício em cada grupo experimental, separadamente. No GC, observou-se que, aos 5 dias, ainda havia persistência de intenso infiltrado inflamatório monomorfonuclear, ao passo que aos 10 dias, células monomorfonucleares eram vistas esparsamente em meio ao processo de fibroplasia ($p=0,008$). No tocante ao padrão organizacional do colágeno, houve diferença estatisticamente significativa, pois no segundo período de estudo, as secções histológicas já apresentavam áreas com fibras delicadas e outras, com feixes mais organizados ($p=0,008$). A variável densidade vascular manteve-se constante em ambos os dias de análise ($p>0,05$).

No GL, constatou-se que o processo inflamatório foi moderado no 5º dia e oscilou para leve no 10º dia do experimento, com tendência à resolução. Houve concomitante diminuição do percentual de células monomorfonucleares e aumento da expressão de colágeno no décimo dia. Quanto à densidade vascular, esta manteve-se constante nos dois períodos. Não houve diferenças significativas entre os dois períodos avaliados no que diz respeito às variáveis descritas ($p>0,05$); (Tabela1).

O grupo GGO apresentou o mesmo padrão de resposta inflamatória moderada nos dois períodos estudados, com persistência de infiltrado de células monomorfonucleares e presença de fibras colágenas finas e delicadas, frouxamente organizadas em algumas áreas e mais espessas e grossas em outras ($p>0,05$). Houve aumento significativo no número de vasos na derme de 5 para 10 dias do estudo, o qual evoluiu de leve para moderado ($p=0,032$); (Tabela 1).

Sob a forma de óleo ozonizado, no grupo GOO, observou-se que o ozônio induziu de forma significativa uma redução da intensidade do grau de inflamação no 10º dia ($p=0,016$). Houve correspondente diminuição do percentual de células inflamatórias monomorfonucleares, sem significância estatística ($p>0,05$). Com relação ao padrão organizacional do colágeno, embora houvesse aumento de feixes colagênicos mais espessos e organizados em todas as secções histológicas, essa diferença entre os períodos não foi significativa ($p>0,05$). Aspectos semelhantes foram observados no tocante à densidade vascular, que passou de moderada no 5º dia para intensa no período seguinte ($p>0,05$); (Tabela 1).

Tabela 1 - Comparação entre os tempos estratificados por grupo

Variável	Resultado	GC		GL		GGO		GOO	
		5 dias Med (q1-q3)	10 dias Med (q1-q3)	5 dias Med (q1-q3)	10 dias Med (q1-q3)	5 dias Med (q1-q3)	10 dias Med (q1-q3)	5 dias Med (q1-q3)	10 dias Med (q1-q3)
Infiltrado inflamatório	p-valor	3(2,5-3)	4(4-4)	3(3-3,5)	4(3,5-4)	3(3-3)	3(3-3,5)	3(3-3)	4(3,5-4)
		0,008*		0,151		0,690		0,063	
Intensidade da inflamação	p-valor	3(2-3)	1(1-1)	2 (1,5-2)	1(1-1,5)	2(2-2)	2(1-2)	2(2-2)	1(1-1)
		0,008*		0,151		0,310		0,016*	
Colágeno	p-valor	1(1-1)	2(2-2,5)	2(2-2)	3(2-3)	2(1,5-2)	2(2-2)	1,5(1-2)	2(2-3)
		0,008*		0,151		0,690		0,111	
Densidade vascular	p-valor	1(1-1,5)	1(1-2)	1(1-2)	1(1-1,5)	1(1-1,5)	2(2-2,5)	2(2-2,75)	3(2,5-3)
		0,069		0,690		0,032*		0,190	

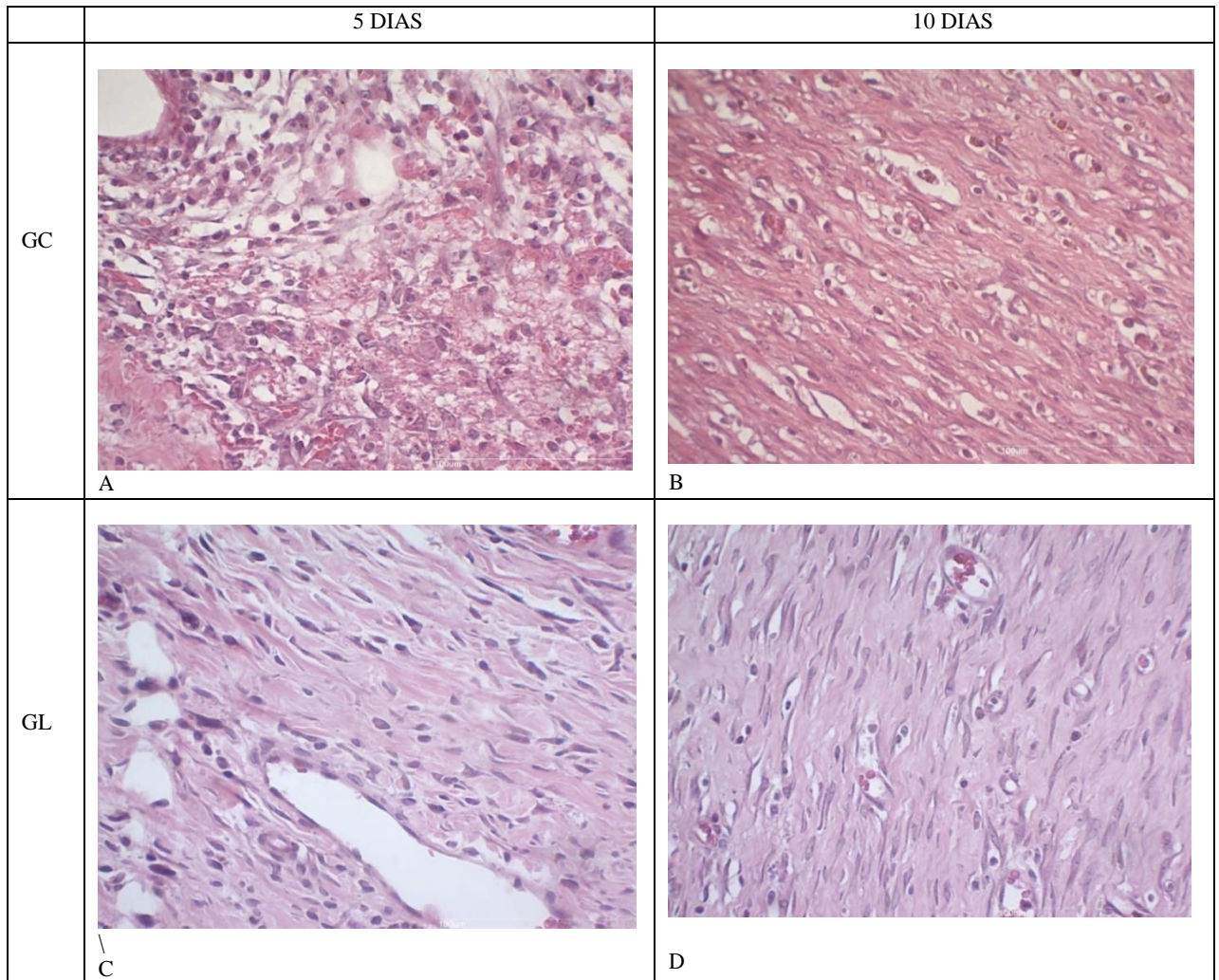
*p<0,05

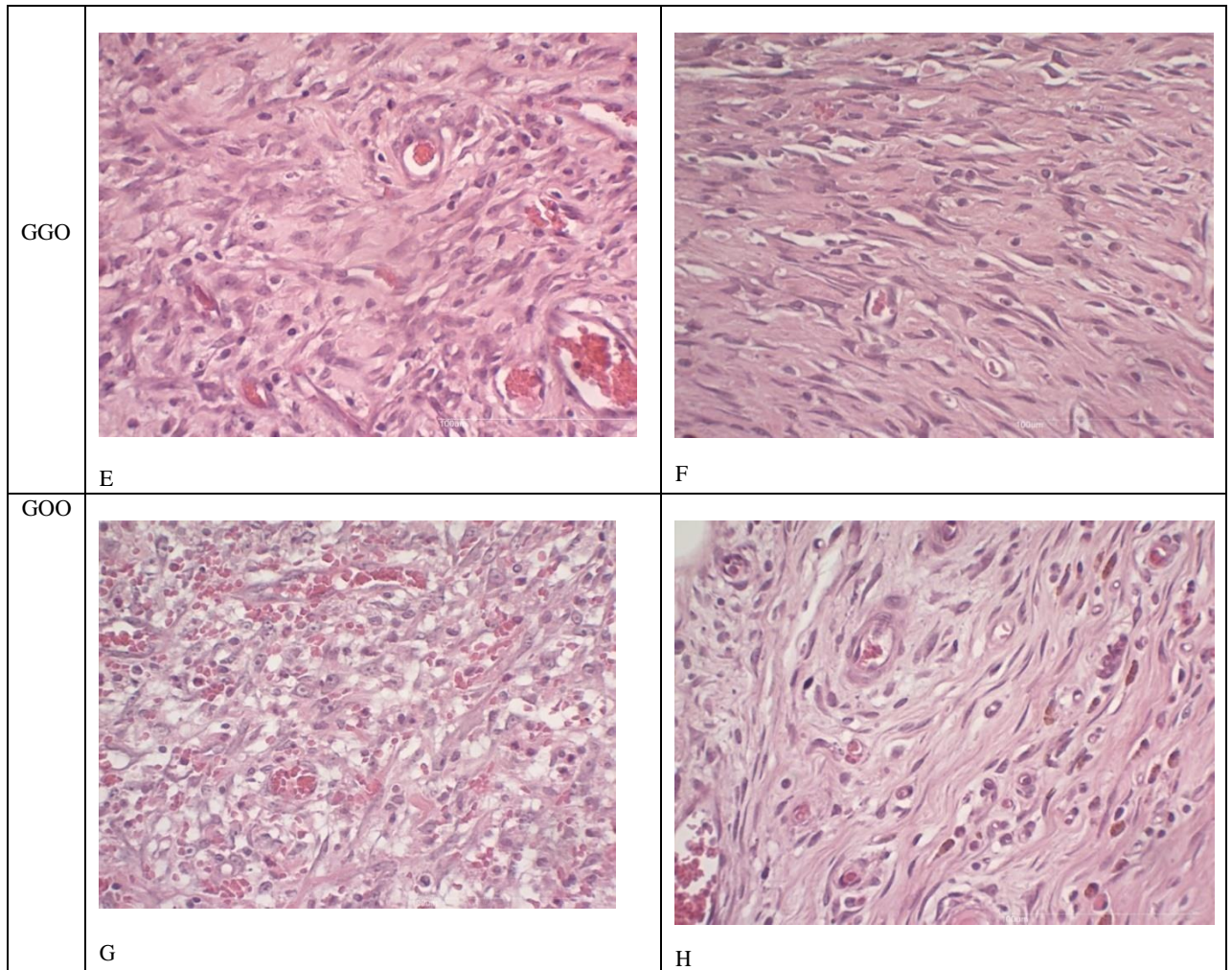
No quinto dia após o sacrifício, observou-se presença de processo inflamatório crônico essencialmente representado por células monomorfonucleares em todos os grupos experimentais ($p>0,05$). Quando se analisou a intensidade da reação inflamatória neste mesmo período, constatou-se que apenas o GC apresentou grau intenso, ao passo que os grupos submetidos às terapias biomoduladoras exibiram grau moderado. Esta diferença foi estatisticamente significativa entre o GC e o GL ($p=0,033$). A análise do padrão organizacional das fibras colágenas evidenciou resultados semelhante pois o GC apresentou fibras mais delicadas, frouxamente organizadas e GL, GGO e GOO, já exibiam fibras colágenas mais espessas e grossas em algumas áreas das secções analisadas. Contudo, esta diferença foi significativa apenas entre os grupos GC e GL ($p=0,012$). A formação de novos vasos sanguíneos presente no tecido de granulação existente na derme dos animais, representada pela variável densidade vascular, foi estatisticamente significativa no GOO em relação a GC, GL e GGO, pois em GOO houve grau moderado desta variável e nos demais grupos, leve ($p=0,045$). (Tabela 2 e Figura 6).

Tabela 2 - Comparação entre os grupos estratificados por tempo

Variável	Resultado	5 dias				10 dias			
		GC Med (q1-q3)	GL Med (q1-q3)	GGO Med (q1-q3)	GOO Med (q1-q3)	GC Med (q1-q3)	GL Med (q1-q3)	GGO Med (q1-q3)	GOO Med (q1-q3)
Infiltrado inflamatório	p-valor	3(2,5-3)	3(3-3,5)	3(3-3)	3(3-3)	4(4-4) ^A	4(3,5-4)	3(3-3,5) ^B	4(3,5-4)
		0,308				0,043			
Intensidade da inflamação	p-valor	3(2-3) ^A	2(1,5-2) ^B	2(2-2)	2(2-2)	1(1-1)	1(1-1,5)	2(1-2)	1(1-1)
		0,033				0,068			
Colágeno	p-valor	1(1-1) ^A	2(2-2) ^B	2(1,5-2)	1,5(1-2)	2(2-2,5)	3(2-3)	2(2-2)	2(2-3)
		0,012				0,210			
Densidade vascular	p-valor	1(1-1,5)	1(1-2)	1(1-1,5)	2(2-2,75)	1(1-2) ^A	1(1-1,5) ^A	2(2-2,5)	3(2,5-3) ^B
		0,045				0,004			

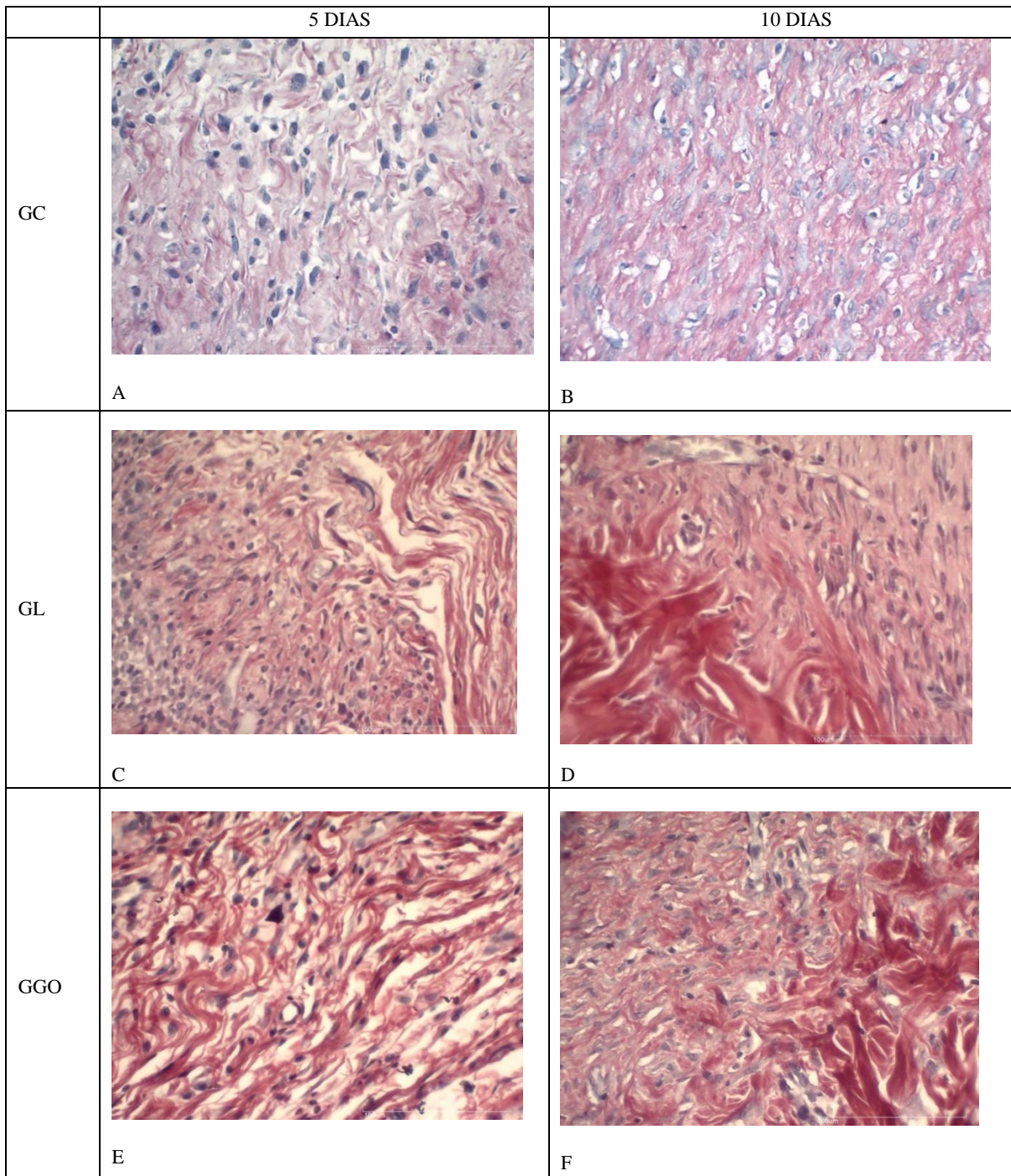
Figura 6 - Análise morfológica dos grupos experimentais. Fotomicrografias de secções histológicas (HE) obtidas na objetiva de 40x das regiões dos ferimentos cutâneos padronizados, que ilustram as características histomorfológicas nos grupos com 5 e 10 dias. Nota-se que no 5º dia, os grupos GC (A), GL (C), GGO (E) e GOO (G) evidenciaram aspectos similares com presença de infiltrado inflamatório monomorfonuclear, característico de inflamação crônica difusa com intensidade que variou de moderada e intensa e inúmeros vasos sanguíneos (setas). No período de 10 dias, GC (B), GL (D), GGO (F) e GOO (H) apresentaram características compatíveis com etapas mais avançadas do processo de cicatrização, com inflamação leve e uma área maior de fibroplasia.

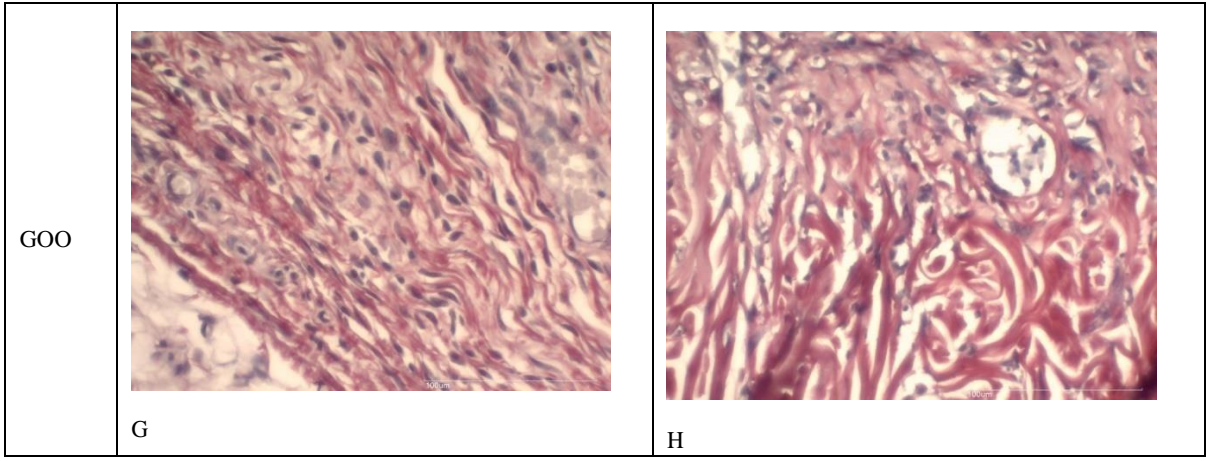




No segundo período de análise semiquantitativa destas variáveis, correspondente a 10 dias, o GGO ainda apresentava presença de células monomorfonucleares na área do ferimento e grau moderado de inflamação crônica. Os grupos GC, GL e GOO não evidenciaram sinais de inflamação crônica, mas sim, crescente fibroplasia. Esta diferença demonstrou ser estatisticamente significativa entre os grupos GC e GGO ($p=0,043$). Em relação ao padrão organizacional das fibras colágenas, o GL exibiu fibras espessas, grossas e densamente organizadas vistas em todas as áreas das seções histológicas da derme. Já os grupos GC, GGO e GOO apresentaram um misto de fibras colágenas finas e delicadas e, em outras áreas, fibras mais espessas ($p>0,05$). Neste tempo de análise, embora o tecido de granulação típico não fosse mais visualizado em nenhum dos grupos, todos continuaram a apresentar vasos sanguíneos na área da ferida. Nos grupos GC e GL, a densidade vascular foi leve, no GGO foi moderada e no GOO, intensa, com significância estatística quando comparada aos grupos GC e GL ($p=0,004$). (Tabela 2 e Figura 7)

Figura 7 - Análise morfológica dos grupos experimentais. Fotomicrografias de secções histológicas (Sírius vermelho) obtidas na objetiva de 40x das regiões dos ferimentos cutâneos padronizados, que ilustram as características histomorfológicas nos grupos com 5 e 10 dias. Nota-se que no 5º dia, o GC (A) apresentou fibras mais delicadas, frouxamente organizadas e GL (C), GGO (E) e GOO (G), já exibiam fibras colágenas mais espessas e grossas em algumas áreas das secções analisadas. Aos dez dias, o padrão organizacional das fibras colágenas foi semelhante nos grupos GC (B), GGO (F) e GOO (H), à exceção do GL (D) que exibiu fibras espessas, grossas e densamente organizadas.





6 DISCUSSÃO

Este estudo experimental objetivou avaliar comparativamente as alterações teciduais inerentes ao reparo tecidual sob a influência de três terapias biomoduladoras. Foi enfatizada a análise do período de tempo correspondente à transição da fase proliferativa ao início da fase de remodelamento, representadas pelos 5° e 10° dias de evolução da cicatrização cutânea. As terapias biomoduladoras utilizadas já tem sido extensivamente investigadas na literatura, contudo, até o momento, poucos estudos contemplaram análise dos efeitos da fotobiomodulação laser em comparação ao ozônio, em especial, desenvolvidos em modelos experimentais. O modelo experimental clássico de cicatrização cutânea adotado no presente estudo permitiu maior controle de variáveis externas e uma boa reprodutibilidade das diferentes fases do reparo, além de apresentar fácil exequibilidade. Na literatura, existem inúmeros estudos que foram realizados nos mesmos moldes desta pesquisa.^{29,66}

A evolução esperada no reparo tecidual, quando não há interferência de terapias biomoduladoras, nos dois períodos analisados, ficou evidente nos resultados do GC deste experimento que, apresentou evolução de predominância de processo inflamatório crônico para resolução e cicatrização; intensidade de inflamação de intensa para leve e apresentação do colágeno de fibras finas e delicadas, frouxamente organizadas para um misto dessa apresentação com áreas de colágeno mais espesso e grosso ($p=0,008$). Nos grupos que foram aplicadas as terapias estudadas os resultados apresentados foram diferentes em várias variáveis do grupo controle. Vale destacar que houve diferença estatisticamente significativa do GGO quando avaliada a densidade vascular que apresentava no 5° dia presença leve de vasos para presença moderada no 10° dia ($p=0,032$). Resultado semelhante ao do estudo de Pchepiorka et al., (2020)⁶⁷ que avaliaram histologicamente a cicatrização de mucosa oral em ratos após aplicação de injeção de gás ozônio nos dias 1, 3 e 7 que se seguiram a cirurgia. Observou-se que a angiogênese foi 4 vezes maior no grupo tratado com ozônio. No GOO a intensidade da inflamação evoluiu de forma significativa de moderada para leve entre os dias avaliados ($p=0,016$). O estudo de Kim et al., (2009)⁵¹ que avaliou a cicatrização de feridas em ratos após terapia com óleo ozonizado no 7° dia apresentou resultados favoráveis ao processo cicatricial porém, não investigou diretamente o infiltrado inflamatório e sim, colágeno e fatores de crescimento.

Em recente revisão sistemática da literatura desenvolvida por Andrade et al., (2022)⁶⁸ foram identificados apenas 5 estudos em animais que, assim como a presente pesquisa, avaliaram comparativamente os efeitos da PBM e da ozonioterapia. Entretanto, nenhum dos estudos citados avaliou a ação destas terapias biomoduladoras no reparo cutâneo. Os estudos de Kazancioglu et al., (2013)⁸ e o de Alan et al., (2015)⁷ analisaram o efeito das terapias biomoduladoras na cicatrização óssea. No primeiro, as terapias foram aplicadas três vezes por semana, por duas semanas, em defeitos ósseos críticos da calvária de ratos. O ozônio foi aplicado com uma sonda sobre a área do defeito na concentração de 80% por 120 segundos e na PBM foi utilizado um laser diodo (808nm, 0,1W, 4J/cm²) por 120 segundos. O tecido ósseo foi avaliado no dia 30 após a realização da lesão experimental. Os grupos tratados com PBM e ozônio demonstraram efeito superior estatisticamente significativo no tocante à neoformação óssea em comparação com o grupo controle ($p < 0,05$). No segundo estudo, os autores reproduziram um modelo experimental de defeito ósseo em fêmures de ratos. Houve variação nos parâmetros da PBM pois foi utilizado um laser diodo semiconductor de As-Al-Ga (810nm, 0,3W, 12J/cm²), 3 vezes por semana em dias alternados por 4 semanas. O ozônio foi administrado topicamente, com concentração de 80%, através de uma sonda, por 30 segundos. Foi realizada análise histomorfométrica em dois períodos distintos, correspondentes a 4 e 8 semanas. A histomorfometria evidenciou áreas maiores de osso neoformado e maior número de células osteocalcina positivas nos grupos tratados com PBM e ozônio em relação aos animais controles, em especial na 8ª semana do período pós-operatório ($p < 0,05$).

No contexto do potencial regenerativo do tecido nervoso, os estudos de Yucesoy et al., (2017)⁹ e Yuca et al., (2020)¹⁰ avaliaram o efeito da PBM e ozonioterapia na regeneração de lesão de nervo facial em ratos. Foi utilizado, no primeiro estudo, PBM por LED (618nm, 20mW, 6J/cm²) aplicada no trajeto do nervo, por 5 minutos diariamente por 21 dias. O gás ozônio foi aplicado também por 21 dias através de uma sonda, com concentração de 75% por 60 segundos. Já no estudo de Yuca et al., (2020)¹⁰ os autores utilizaram PBM por LED (850nm, 100mW, 4J/cm²), por 32 segundos, durante 21 dias consecutivos e a ozonioterapia foi administrada na concentração de 2,5% de O₃ e 97,5% de O₂ por via insuflação peritoneal, por 21 dias. Em ambos os estudos, foi observado que os animais tratados com as duas terapias exibiram um padrão organizacional mais favorável dos feixes nervosos correspondentes ao nervo facial quando comparados aos controles ($p < 0,05$).

Diante do exposto, pode-se verificar que os quatro estudos citados avaliaram a ação das terapias biomoduladoras comparativamente através da análise de variáveis do reparo tecidual em diferentes modelos experimentais. Sendo assim, a realização do presente estudo pode ser justificada uma vez que seu escopo se deteve à avaliação de outros parâmetros histomorfológicos do reparo, em tecido diferente daqueles já descritos, a saber, a pele. Neste sentido, o estudo que mais se aproximou do modelo experimental utilizado foi o de Bayer et al., (2017)¹¹ cujos autores avaliaram comparativamente a ação da PBM (diodo, 940nm, 1Wx20seg, 7,4J/cm², por 5 dias) e da ozonioterapia (aplicado com sonda de tecido estéril, acoplada a peça de mão, guiada manualmente sobre a área ulcerada, 80%, 120 segundos por dia, por 5 dias), em úlceras de mucosite oral induzida experimentalmente através da administração de 5-FU por via intraperitoneal em ratos. As secções de mucosa oral dos 24 ratos utilizados neste estudo foram processadas histologicamente para imunistoquímica com anticorpos monoclonais anti-bFGF, TGF- β e PDGF. O grupo experimental tratado com PBM apresentou maior número de células bFGF e PDGF positivas e esta diferença foi estatisticamente significativa em relação aos demais grupos. Embora a pele e a mucosa oral sejam geralmente semelhantes no tocante à presença de biomoléculas ou em sua morfologia e funções, existem diferenças nas condições homeostáticas que devem ser levadas em consideração ao comparar o processo de cicatrização em ambos os tipos de tecidos segundo destacado por Waasdorp et al., (2021)⁶⁹. Por esta razão, acredita-se que o presente estudo poderá ampliar o conhecimento já existente sobre o reparo que envolve os tecidos epitelial e conjuntivo, uma vez que avaliou as principais variáveis histológicas que participam deste evento na matriz extracelular da derme e na epiderme de ratos.

No que diz respeito à intensidade da inflamação no quinto dia do período pós-operatório do presente estudo, observou-se que todas as terapias biomoduladoras apresentaram redução desta variável em relação ao grupo controle (GC). Contudo, apenas o grupo experimental submetido à fotobiomodulação (GL) evidenciou menor grau de inflamação com significância estatística ($p=0,033$). Este resultado corrobora aquele descrito por Suzuki & Takakuda (2016)³⁷ que avaliaram reparo cutâneo de ratos. No 3º dia do período pós-operatório, os autores constataram diminuição significativa do infiltrado monomorfonuclear nos grupos tratados com PBM diodo semiconductor de AlGaInP (660 nm, 20 mW, 1/ 5/ e 10 J/cm²) em relação aos controles ($p<0,01$). Os autores concluíram que a PBM pareceu suprimir adequadamente a inflamação. Outro estudo semelhante realizado por de Melo Rambo et al., (2014)³⁵ avaliou o reparo tecidual em ratos jovens e idosos, utilizando PBM (660 nm, 30 mW, 72 J/cm²). Os autores

observaram um declínio significativo da expressão de RNAm das proteínas IL-1 β e TN-alfa na derme de ratos idosos e jovens que receberam PBM quando comparados, respectivamente, ao grupo controle de ratos idosos e jovens 3 e 7 dias após a realização do ferimento cutâneo ($p < 0,05$). De fato, o impacto da PBM na atenuação da intensidade do processo inflamatório no presente estudo ratifica uma propriedade desta terapia já sedimentada na literatura.

Ainda no período de 5 dias em nosso estudo, constatou-se evidente aceleração do reparo tecidual relacionada com o aumento da biossíntese de colágeno no GL. Apenas o GL apresentou diferença estatisticamente significativa com relação à análise semiquantitativa do colágeno quando comparado aos demais grupos ($p = 0,012$). O estudo de Fiório et al., (2014)⁴⁰ que realizou queimaduras padronizadas em pele de ratos com vistas à análise da cicatrização cutânea, documentou a ação da PBM com laser diodo semiconductor de InGaAlP (660 nm, 35 mW, 3 e 4 J/cm²). Nos dias 8 e 16, após a queimadura, a secção tecidual corada com Sírius vermelho foi avaliada através da técnica de microscopia com luz polarizada, e os resultados desta análise demonstraram que o percentual do colágeno tipo I foi significativamente menor no grupo controle do que nos grupos que receberam tratamento com PBM. Em seu estudo experimental com ratos, Castro et al., (2020)⁶⁶ realizaram enxerto de pele e terapia com PBM (660 nm, 40 mW, 2,4 J/cm²) na área correspondente à lesão. A PBM com diodo semiconductor AsGaAl foi realizada imediatamente após o procedimento cirúrgico e a cada 24 horas. No 7º dia do período pós-operatório, foi evidenciado que os animais submetidos à PBM apresentaram não só maior quantidade de fibras colágenas em relação aos controles ($p = 0,04$), mas também um melhor padrão organizacional do colágeno ao grupo controle. Achados semelhantes foram documentados por Fortuna et al., (2018)⁴² cujo estudo teve como objetivo investigar os efeitos da PBM (gálio-alumínio-arsênio, 670 nm, 9 mW, 670 nm, 0,031 W/cm, 4J/cm) na neoangiogênese e fibroplasia durante a remodelação tecidual, 14, 21, 28 e 35 dias após a ferida. A expressão de colágeno foi significativamente maior no grupo laser em comparação com o grupo controle nos dias 14 e 21 após a criação da ferida cutânea ($p = 0,008$; $p = 0,016$). Dessa forma, nossos resultados confirmam os dados destes autores e fortalecem o conhecimento de que a PBM pode modular a biossíntese do colágeno tanto quantitativa quanto qualitativamente. O método de análise das fibras colágenas utilizado, primeiramente descrito por Alvarenga et al., (2020)⁶⁵ foi útil para avaliar não só o grau de presença de colágeno na matriz extracelular como o arranjo organizacional das fibras nos diferentes grupos experimentais, o qual foi mais organizado no grupo tratado com PBM.

A formação dos novos vasos sanguíneos representa uma etapa crítica do reparo tecidual e é um evento chave que se desenrola na fase proliferativa. Segundo Veith et al., (2019)¹⁵, além de garantir o aporte de oxigênio, nutrientes e células tronco hematopoiéticas ao novo tecido em formação, a neoangiogênese pode ser estimulada por macrófagos M2, os quais estão mais fortemente associados à atividade angiogênica devido à biossíntese de diferentes mediadores químicos. No presente estudo o grupo tratado com óleo ozonizado apresentou aumento significativo da densidade vascular quando comparado a todos os grupos no dia 5 ($p=0,045$). Resultado semelhante foi observado no dia 10 deste experimento apresentando diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e o grupo laser ($p=0,004$). Os resultados do presente estudo apresentam concordância também com aqueles observados por outros autores a exemplo de Valacchi et al., (2011)⁵⁵ que avaliaram a via de administração em óleo para o ozônio, comparando três graus de valor de peróxido aplicado sobre feridas cutâneas de ratos. O nível mais alto de angiogênese foi encontrado no tratamento das feridas com óleo de valor de peróxido (VP) médio no dia 3 e 7 avaliados ($p<0,001$). Ademais, Kirkil et al., (2016)⁷⁰, em seu estudo experimental em pele de ratos, testaram o uso do azeite e do azeite ozonizado aplicados sobre ferida cutânea duas vezes ao dia, por sete dias. Tais autores concluíram que tanto o azeite puro quanto o ozonizado contribuíram significativamente para o aumento da neovascularização através da avaliação do número de células VEGF e CD34 positivas ($p<0,001$), porém o efeito do óleo ozonizado sobre a microvasculatura foi significativamente maior que o do óleo puro.

A fim de aumentar a sensibilidade e a especificidade da análise da formação de novos vasos sanguíneos geralmente são utilizados marcadores de células endoteliais como anticorpos anti-Fator VIII, anti-VEGF, e anti-CD34 na técnica de imunistoquímica.⁴² Neste sentido, urge destacar uma limitação do presente estudo no que diz respeito à análise da neoangiogênese. Na contagem de vasos sanguíneos em seções coradas com Hematoxilina-eosina, foi necessário se ater aos aspectos morfológicos que permitiram a identificação de pequenos vasos como a presença de revestimento íntegro do epitélio pavimentoso simples na parede vascular e possível presença ou ausência de eritrócitos no lúmen. Contudo, este mesmo método de análise foi realizado por Calisto et al., (2015)⁷¹ quando estes autores avaliaram o efeito da PBM (660nm, 100mW, 10 J/cm²) em ferimentos mais profundos que se estendiam até o tecido muscular, em um modelo experimental de cicatrização por segunda intenção. Foi utilizada coloração com Hematoxilina e Eosina para análise semiquantitativa de presença de vasos neoformados no dia 6 do período pós-operatório. Através da utilização de uma metodologia semelhante que

envolveu análise de secções de mucosa oral coradas com Hematoxilina e Eosina, Pchepiorka et al., (2020) ⁶⁷ analisaram o efeito da injeção com gás ozônio na cicatrização de ferimentos padronizados induzidos experimentalmente neste tecido. Os autores utilizaram uma escala numérica de cicatrização para a análise histomorfométrica e concluíram que a ozonioterapia foi eficaz para acelerar a cicatrização das feridas com aumento da angiogênese 3 dias após a cirurgia ($p < 0,05$). Dessa forma, embora os resultados do presente estudo sejam diferentes em relação a esta variável à luz da fotobiomodulação, o mesmo método de análise nos permitiu verificar que o óleo ozonizado estimulou a neoangiogênese em tempo de análise próximo ao do estudo citado.

No presente estudo, no período de 10 dias, ainda que todos os animais de todos os grupos já apresentavam a ferida fechada clinicamente, constatou-se que a intensidade da inflamação se manteve maior (no grupo de animais tratados com gás ozônio quando comparado aos outros grupos experimentais, em especial o grupo Controle ($p = 0,043$)). Este resultado pode ser justificado pelo fato de que o gás ozônio é capaz de modular o estresse oxidativo, através da ativação do fator transcricional nuclear kappa B (NF- κ B). O NF- κ B ativa a transcrição de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 beta e TNF-alfa que atuam na fase inicial da inflamação. O período exato da ação do gás ozônio no tecido ainda é desconhecido e em nosso estudo, parece ter se perpetuado em função do surto oxidativo inicial. De fato, existem evidências de que o ozônio pode estimular a produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) derivado de células imunes para destruir patógenos e a geração de EROs parece ser um fator determinante para eficácia e/ou toxicidade do ozônio.²

O presente estudo utilizou duas vias de administração do ozônio: injeção do gás no entorno da ferida e aplicação tópica com óleo ozonizado. Outros estudos na literatura tem também investigado diferentes formas de aplicação do ozônio em outros tipos de tecidos. Neste sentido, o estudo experimental em ratos de Erdemci et al., (2014) ⁷² avaliou a ação da aplicação tópica do gás durante 30 segundos, com a concentração de 80%, via sonda intra oral e a ação sistêmica, por injeção intraperitoneal na concentração 0,7 mg/Kg, na neoformação óssea após exodontia do incisivo central superior direito. Os animais foram sacrificados no 14º e 28º dias e os autores relataram que os resultados histomorfométricos observados no grupo de animais tratados com ozônio por via intraperitoneal foram significativos quando comparados àqueles do grupo controle e do grupo submetido a aplicação tópica do gás. De fato, na área odontológica a terapia com ozônio tem sido utilizada no tratamento de cárie dentária, doenças gengivais, periodontais e lesões da mucosa oral oriundas de contaminação bacteriana, viral e fúngica, pois segundo Sen

& Sen, (2020)⁷³ o ozônio pode danificar a membrana citoplasmática dos microrganismos como consequência da ozonólise e, adicionalmente, promover alterações no conteúdo intracelular devido ao efeito oxidante secundário.

A despeito dos resultados favoráveis relacionados ao uso das terapias biomoduladoras documentados e discutidos no presente estudo, existem resultados divergentes na literatura, em especial no tocante às variáveis histológicas relacionadas ao processo inflamatório^{31,71} e área do colágeno^{50,67}. É importante ressaltar a existência de ampla variabilidade de técnicas de avaliação, assim como de variáveis histológicas e períodos de análise. A busca por protocolos padronizados, em especial da ozonioterapia, ainda pode ser considerada um tema relevante a ser explorado em outras pesquisas, tanto de caráter experimental, como envolvendo seres humanos. Em adição a esse aspecto, os nossos resultados parecem também indicar que a PBM e a ozonioterapia apresentam diferentes mecanismos de ação sobre o tecido lesionado, de modo que se sugere a realização de mais estudos que contemplem o impacto de tais terapias no tecido, de forma isolada e em períodos de tempo mais precoces do reparo tecidual.

7 CONCLUSÃO

Em conclusão, pode-se sugerir um papel positivo das terapias PBM, ozonioterapia com injeção de gás e aplicação de óleo ozonizado na promoção da cicatrização de feridas. Comparativamente nota-se que o efeito sobre as variáveis analisadas são distintas para as diferentes terapias pois o óleo ozonizado se destacou pela promoção do aumento da vascularização e a PBM pela organização do colágeno e redução da inflamação. Pode-se observar também que a aplicação do ozônio na forma de gás perpetuou o processo inflamatório crônico quando comparado com os demais grupos porém, proporcionou aumento da neovascularização quando a terapia foi avaliada nos dois períodos do estudo.

REFERÊNCIAS

1. Müller KP, Rodrigues CRMD, Núñez SC, Rocha R, Jorge AOC, Ribeiro MS. Effects of low power red laser on induced-dental caries in rats. *Arch Oral Biol.* 2007 Jul;52(7):648–54.
2. Zeng J, Lu J. Mechanisms of action involved in ozone-therapy in skin diseases. *Int Immunopharmacol.* 2018 Mar;56:235–41.
3. Nesi-Reis V, Lera-Nonose DSSL, Oyama J, Silva-Lalucci MPP, Demarchi IG, Aristides SMA, et al. Contribution of photodynamic therapy in wound healing: A systematic review. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2018 Mar;21:294–305.
4. Dörtbudak O, Haas R, Mailath-Pokorny G. Biostimulation of bone marrow cells with a diode soft laser. *Clin Oral Implants Res [Internet].* 2000 Dec;11(6):540–5. Available from:<http://doi.wiley.com/10.1034/j.1600-0501.2000.011006540.x> .
5. de Castro JR, da Silva Pereira F, Chen L, Arana-Chavez VE, Ballester RY, DiPietro LA, Simões A. Improvement of full-thickness rat skin wounds by photobiomodulation therapy (PBMT): A dosimetric study. *J Photochem Photobiol B.* 2020 Mar 14;206:111850. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2020.111850. Epub ahead of print. PMID: 32203726.
6. Bocci VA. Scientific and Medical Aspects of Ozone Therapy. State of the Art. *Arch MedRes.* 2006 May;37(4):425–35.
7. Alan H, Vardi N, Özgür C, Hüseyin A, Yolcu Ü, Doğan DO. Comparison of the Effects of Low-Level Laser Therapy and Ozone Therapy on Bone Healing. *Journal of Craniofacial Surgery.* 2015 Jul;26(5):e396–400.
8. Kazancioglu HO, Ezirganli S, Aydin MS. Effects of Laser and Ozone Therapies on Bone Healing in the Calvarial Defects. *Journal of Craniofacial Surgery.* 2013 Nov;24(6):2141–6.
9. Yucesoy T, Kutuk N, Canpolat DG, Alkan A. Comparison of Ozone and Photo-Biomodulation Therapies on Mental Nerve Injury in Rats. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery.* 2017 Nov;75(11):2323–32.
10. Yuca Y, Yucesoy T, Tok OE, Alkan A. The efficiency of ozone therapy and low-level lasertherapy in rat facial nerve injury. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery.* 2020 Mar;48(3):308–14.
11. Bayer S, Kazancioglu HO, Acar AH, Demirtas N, Kandas NO. Comparison of laser and ozone treatments on oral mucositis in an experimental model. *Lasers Med Sci.* 2017 Apr 11;32(3):673–7.
12. Hesketh M, Sahin KB, West ZE, Murray RZ. Macrophage Phenotypes Regulate Scar Formation and Chronic Wound Healing. *Int J Mol Sci.* 2017 Jul 17;18(7):1545.
13. Reinke JM, Sorg H. Wound Repair and Regeneration. *European Surgical Research.*

- 2012;49(1):35–43.
14. Harn HI, Ogawa R, Hsu C, Hughes MW, Tang M, Chuong C. The tension biology of wound healing. *Exp Dermatol*. 2019 Apr 20;28(4):464–71.
 15. Veith AP, Henderson K, Spencer A, Sligar AD, Baker AB. Therapeutic strategies for enhancing angiogenesis in wound healing. *Adv Drug Deliv Rev*. 2019 Jun;146:97–125.
 16. Raziyeveva K, Kim Y, Zharkinbekov Z, Kassymbek K, Jimi S, Saparov A. Immunology of Acute and Chronic Wound Healing. *Biomolecules*. 2021 May 8;11(5):700.
 17. de Oliveira S, Rosowski EE, Huttenlocher A. Neutrophil migration in infection and wound repair: going forward in reverse. *Nat Rev Immunol*. 2016 Jun 27;16(6):378–91.
 18. Guo Y, Lin C, Xu P, Wu S, Fu X, Xia W, et al. AGEs Induced Autophagy Impairs Cutaneous Wound Healing via Stimulating Macrophage Polarization to M1 in Diabetes. *SciRep*. 2016 Dec 2;6(1):36416.
 19. Sorg H, Tilkorn DJ, Hager S, Hauser J, Mirastschijski U. Skin Wound Healing: An Update on the Current Knowledge and Concepts. *European Surgical Research*. 2017;58(1–2):81–94.
 20. Velnar T, Bailey T, Smrkolj V. The Wound Healing Process: An Overview of the Cellular and Molecular Mechanisms. *Journal of International Medical Research*. 2009 Oct 1;37(5):1528–42.
 21. Piipponen M, Li D, Landén NX. The Immune Functions of Keratinocytes in Skin Wound Healing. *Int J Mol Sci*. 2020 Nov 20;21(22):8790.
 22. Monavarian M, Kader S, Moeinzadeh S, Jabbari E. Regenerative Scar-Free Skin Wound Healing. *Tissue Eng Part B Rev*. 2019 Aug;25(4):294–311.
 23. Rodrigues M, Kosaric N, Bonham CA, Gurtner GC. Wound Healing: A Cellular Perspective. *Physiol Rev*. 2019 Jan 1;99(1):665–706.
 24. Robert S, Gicquel T, Victoni T, Valença S, Barreto E, Bailly-Maître B, et al. Involvement of matrix metalloproteinases (MMPs) and inflammasome pathway in molecular mechanisms of fibrosis. *Biosci Rep*. 2016 Aug 1;36(4).
 25. Desmouliere A, Darby IA, Laverdet B, Bonté F. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. *Clin Cosmet Investig Dermatol*. 2014 Nov;301.
 26. Kumar V. Robbins Patologia Básica. (10th edição). [Digite o Local da Editora]: Grupo GEN;2018.
 27. Wilkinson HN, Hardman MJ. Wound healing: cellular mechanisms and pathological outcomes. *Open Biol*. 2020 Sep 30;10(9):200223.
 28. Keshri GK, Gupta A, Yadav A, Sharma SK, Singh SB. Photobiomodulation with Pulsed and Continuous Wave Near-Infrared Laser (810 nm, Al-Ga-As) Augments Dermal Wound Healing in Immunosuppressed Rats. *PLoS One*. 2016 Nov 18;11(11):e0166705.

29. Medrado AP, Soares AP, Santos ET, Reis SRA, Andrade ZA. Influence of laser photobiomodulation upon connective tissue remodeling during wound healing. *J Photochem Photobiol B*. 2008 Sep;92(3):144–52.
30. Uzêda-e-Silva VD, Rodriguez TT, Rocha IAR, Xavier FCA, dos Santos JN, Cury PR, et al. Laser phototherapy improves early stage of cutaneous wound healing of rats under hyperlipidic diet. *Lasers Med Sci*. 2016 Sep 13;31(7):1363–70.
31. Moreira SH, Pazzini JM, Álvarez JLG, Cassino PC, Bustamante CC, Bernardes FJL, et al. Evaluation of angiogenesis, inflammation, and healing on irradiated skin graft with low-level laser therapy in rats (*Rattus norvegicus albinus wistar*). *Lasers Med Sci*. 2020 Jul 15;35(5):1103–9.
32. Beigom Taheri J, Bagheri F, Mojahedi M, Shamloo N, Nakhostin ohammad R, Azimi S, et al. Comparison of the Effect of Low-Level Laser and Phenytoin Therapy on Skin Wound Healing in Rats. *J Lasers Med Sci*. 2015 Jun 28;6(3):124–8.
33. de Medeiros ML, Araújo-Filho I, da Silva EMN, de Sousa Queiroz WS, Soares CD, de Carvalho MGF, et al. Effect of low-level laser therapy on angiogenesis and matrix metalloproteinase-2 immunoexpression in wound repair. *Lasers Med Sci*. 2017 Jan 20;32(1):35–43.
34. Melo VA de, Anjos DCS dos, Albuquerque Júnior R, Melo DB, Carvalho FUR. Effect of low level laser on sutured wound healing in rats. *Acta Cir Bras*. 2011 Apr;26(2):129–34.
35. de Melo Rambo CS, Silva JA, Serra AJ, Ligeiro AP, de Paula Vieira R, Albertini R, et al. Comparative analysis of low-level laser therapy (660 nm) on inflammatory biomarker expression during the skin wound-repair process in young and aged rats. *Lasers Med Sci*. 2014 Sep 7;29(5):1723–33.
36. Tabakoglu HO, Sani MM, Uba AI, Abdullahi UA. Assessment of circular wound healing in rats after exposure to 808-nm laser pulses during specific healing phases. *Lasers Surg Med*. 2016 Apr;48(4):409–15.
37. Suzuki R, Takakuda K. Wound healing efficacy of a 660-nm diode laser in a rat incisional wound model. *Lasers Med Sci*. 2016 Nov 5;31(8):1683–9.
38. Solmaz H, Ulgen Y, Gulsoy M. Photobiomodulation of wound healing via visible and infrared laser irradiation. *Lasers Med Sci*. 2017 May 20;32(4):903–10.
39. Solmaz H, Dervisoglu S, Gulsoy M, Ulgen Y. Laser biostimulation of wound healing: bioimpedance measurements support histology. *Lasers Med Sci*. 2016 Nov 1;31(8):1547–54.
40. Fiório FB, Albertini R, Leal-Junior ECP, de Carvalho P de TC. Effect of low-level laser therapy on types I and III collagen and inflammatory cells in rats with induced third-degree burns. *Lasers Med Sci*. 2014 Jan 16;29(1):313–9.
41. Fiorio FB, dos Santos SA, de Melo Rambo CS, Dalbosco CG, Serra AJ, de Melo BL, et al. Photobiomodulation therapy action in wound repair skin induced in aged rats old: time course of biomarkers inflammatory and repair. *Lasers Med Sci*. 2017 Nov

- 5;32(8):1769–82.
42. Fortuna T, Gonzalez AC, Sá MF, Andrade Z de A, Reis SRA, Medrado ARAP. Effect of 670 nm laser photobiomodulation on vascular density and fibroplasia in late stages of tissue repair. *Int Wound J.* 2018 Apr;15(2):274–82.
 43. Silva DCGG e, Plapler H, Costa MM da, Silva SRG e, Sá M da CA de, Silva BSL e. Low level laser therapy (AlGaInP) applied at 5J/cm² reduces the proliferation of *Staphylococcus aureus* MRSA in infected wounds and intact skin of rats*. *An Bras Dermatol.* 2013Feb;88(1):50–5.
 44. Gonçalves RV, Mezêncio JMS, Benevides GP, Matta SLP, Neves CA, Sarandy MM, et al. Effect of gallium-arsenide laser, gallium-aluminum-arsenide laser and healing ointment on cutaneous wound healing in Wistar rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 2010 Apr;43(4):350–5.
 45. Anzolin A, da Silveira-Kaross N, Bertol C. Ozonated oil in wound healing: what has already been proven? *Med Gas Res.* 2020;10(1):54.
 46. Rowen R. Ozone and oxidation therapies as a solution to the emerging crisis in infectious disease management: a review of current knowledge and experience. *Med Gas Res.* 2019;9(4):0.
 47. Elvis A, Ekta J. Ozone therapy: A clinical review. *J Nat Sci Biol Med.* 2011;2(1):66.
 48. Miliordos E, Xantheas SS. On the Bonding Nature of Ozone (O₃) and Its Sulfur-Substituted Analogues SO₂, OS₂, and S₃: Correlation between Their Biradical Character and Molecular Properties. *J Am Chem Soc.* 2014 Feb 19;136(7):2808–17.
 49. Bocci VA. Scientific and Medical Aspects of Ozone Therapy. State of the Art. *Arch Med Res.* 2006 May;37(4):425–35.
 50. Taqwim Hidayat A, Thohar Arifin M, Nur M, Muniroh M, Susilaningih N. Ozonated Aloe Vera Oil Effectively Increased the Number of Fibroblasts and Collagen Thickening in the Healing Response of Full-Thickness Skin Defects. *Int J Inflam.* 2021 Feb 9;2021:1–8.
 51. Kim HS, Noh SU, Han YW, Kim KM, Kang H, Kim HO, et al. Therapeutic Effects of Topical Application of Ozone on Acute Cutaneous Wound Healing. *J Korean Med Sci.* 2009;24(3):368.
 52. Silva V, Peirone C, Amaral JS, Capita R, Alonso-Calleja C, Marques-Magallanes JA, et al. High Efficacy of Ozonated Oils on the Removal of Biofilms Produced by Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from Infected Diabetic Foot Ulcers. *Molecules.* 2020 Aug 7;25(16):3601.
 53. Díaz M, Veloso M, Pereira P, Sánchez Y, Fernández I, de Andrade J. Assessment of the Physicochemical Quality Indicators and Microbiological Effects of Brazilian Ozonized Vegetable Oils. *J Braz Chem Soc.* 2021;
 54. Pereira LM, Hatanaka E, Martins EF, Oliveira F, Liberti EA, Farsky SH, et al. Effect of oleic and linoleic acids on the inflammatory phase of wound healing in rats. *Cell*

- BiochemFunct. 2008 Mar;26(2):197–204.
55. Valacchi G, Lim Y, Belmonte G, Miracco C, Zanardi I, Bocci V, et al. Ozonated sesame oil enhances cutaneous wound healing in SKH1 mice. *Wound Repair and Regeneration*. 2011 Jan;19(1):107–15.
 56. Moureu S, Violleau F, Ali Haimoud-Lekhal D, Calmon A. Ozonation of sunflower oils: Impact of experimental conditions on the composition and the antibacterial activity of ozonized oils. *Chem Phys Lipids*. 2015 Feb;186:79–85.
 57. Kırkıl C, Yiğit MV, Özeran İH, Aygen E, Gültürk B, Artaş G. The Effect of Ozonated Olive Oil on Neovascularization in an Experimental Skin Flap Model. *Adv Skin WoundCare*. 2016 Jul;29(7):322–7.
 58. Xiao W, Wu M, Bi X. Ozone oil promotes wound healing via increasing miR-21-5p-mediated inhibition of RASA1. *Wound Repair and Regeneration*. 2021 May 30;29(3):406–16.
 59. Suh Y, Patel S, Kaitlyn R, Gandhi J, Joshi G, Smith N, et al. Clinical utility of ozone therapy in dental and oral medicine. *Med Gas Res*. 2019;9(3):163.
 60. Smith N, Wilson A, Gandhi J, Vatsia S, Khan S. Ozone therapy: An overview of pharmacodynamics, current research, and clinical utility. *Med Gas Res*. 2017;7(3):212.
 61. Eckelman WC, Kilbourn MR, Joyal JL, Labiris R, Valliant JF. Justifying the number of animals for each experiment. *Nucl Med Biol*. 2007 Apr;34(3):229–32.
 62. Scheibe PO. Number of samples — hypothesis testing. *Nucl Med Biol*. 2008 Jan;35(1):3–9.
 63. Damy SB, Camargo RS, Chammas R, Figueiredo LF. Aspectos fundamentais da experimentação animal - aplicações em cirurgia experimental *Rev Assoc Med Bras (1992)*. 2010 Jan-Feb;56(1):103-11. Portuguese. doi: 10.1590/s0104-42302010000100024. PMID: 20339795.
 64. Medrado ARAP, Pugliese LS, Reis SRA, Andrade ZA. Influence of low level laser therapy on wound healing and its biological action upon myofibroblasts. *Lasers Surg Med*. 2003 Mar;32(3):239–44.
 65. Alvarenga MOP, Bittencourt LO, Mendes PFS, Ribeiro JT, Lameira OA, Monteiro MC, et al. Safety and Effectiveness of Copaiba Oleoresin (*C. reticulata* Ducke) on Inflammation and Tissue Repair of Oral Wounds in Rats. *Int J Mol Sci*. 2020 May 18;21(10):3568.
 66. Castro TNS, Martignago CCS, Assis L, de Alexandria FED, Rocha JCT, Parizotto NA, et al. Effects of photobiomodulation therapy in the integration of skin graft in rats. *Lasers Med Sci*. 2020 Jun 12;35(4):939–47.
 67. Pchepiorka R, Moreira MS, Lascane NA da S, Catalani LH, Allegrini Jr S, de Lima NB, et al. Effect of ozone therapy on wound healing in the buccal mucosa of rats. *Arch Oral Biol*. 2020 Nov;119:104889.

68. Andrade T de OS, Dantas JB de L, Cerqueira CBS de, Badaró P, Marchionni AMT, Andrade ARAP. Comparative study of the effectiveness of ozone therapy and laser photobiomodulation upon experimental wound repair: systematic review. *Research, Society and Development*. 2022 Apr 17;11(5):e58911528650.
69. Waasdorp M, Krom BP, Bikker FJ, van Zuijlen PPM, Niessen FB, Gibbs S. The Bigger Picture: Why Oral Mucosa Heals Better Than Skin. *Biomolecules*. 2021 Aug 6;11(8):1165.
70. Kırkıl C, Yiğit MV, Özeran İH, Aygen E, Gültürk B, Artaş G. The Effect of Ozonated Olive Oil on Neovascularization in an Experimental Skin Flap Model. *Adv Skin WoundCare*. 2016 Jul;29(7):322–7.
71. Calisto FCF da S, Calisto SL da S, Souza AP de, França CM, Ferreira AP de L, Moreira MB. Use of low-power laser to assist the healing of traumatic wounds in rats. *Acta Cir Bras*. 2015 Mar;30(3):204–8.
72. Erdemci F, Gunaydin Y, Sencimen M, Bassorgun I, Ozler M, Oter S, et al. Histomorphometric evaluation of the effect of systemic and topical ozone on alveolar bone healing following tooth extraction in rats. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2014 Jun;43(6):777–83.
73. Sen S, Sen S. Ozone therapy a new vista in dentistry: integrated review. *Med Gas Res*. 2020;10(4):189.

APÊNDICES

Apêndice A – Artigo intitulado “Análise quanti e semiquantitativa do colágeno no reparo tecidual – um estudo comparativo, publicado na Revista de Ciências Médicas e Biológicas

ARTIGO ORIGINAL

ISSN 1677-5090
© 2022 Revista de Ciências Médicas e Biológicas

DOI:

Análise quanti e semiquantitativa do colágeno no reparo tecidual - um estudo comparativo

Quantitative and semiquantitative analysis of collagen in wound healing - a comparative study

Sarah Souza Lima¹, Beatriz Paim², Flávia Quadros Lima³, Antônio Márcio Teixeira Marchionni⁴, Carlos Maurício Cardeal Mendes⁵, Alena Ribeiro Alves Peixoto Medrado⁶*

¹ Mestranda do Programa de Pós-graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas da Universidade Federal da Bahia; ² Acadêmica do Curso de Nutrição da Universidade Federal da Bahia; ³ Mestranda do Programa de Pós-graduação em Medicina e Saúde Humana da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública; ⁴ Doutor em Laser, Professor Adjunto do Curso de Odontologia da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública; ⁵ Doutor em Saúde Coletiva, Professor do Programa de Pós-graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas da Universidade Federal da Bahia; ⁶ Doutora em Patologia Humana, Professora Associada do Instituto de Ciências da Saúde e do Programa de Pós-graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas da Universidade Federal da Bahia

Resumo

Introdução: diversos estudos têm destacado a relevância do colágeno no contexto do reparo tecidual, em especial, sob influência de diferentes terapias biomoduladoras. A análise do colágeno tem sido realizada mediante diferentes abordagens metodológicas, entre as quais se destacam as análises semiquantitativas e histomorfométrica. **Objetivos** - O presente estudo objetivou comparar os resultados de dois tipos de análise acerca da presença de fibras colágenas na matriz extracelular durante a cicatrização cutânea, em ferimentos fotobiomodulados. **Metodologia:** vinte ratos machos Wistar, foram submetidos à indução de uma ferida cutânea padronizada dorsal e divididos em dois grupos, Controle (GC) e Fotobiomodulado com laser (GL). Os períodos de morte corresponderam ao 5º. e 10º. dias. As seções histológicas foram coradas com Sírius vermelho para análise semiquantitativa e histomorfométrica do colágeno. **Resultados:** dois parâmetros foram utilizados para comparar o defecho primário, um critério de grandeza quantitativa em porcentagem (área de colágeno), e o segundo critério semiquantitativo, com grandezas conferidas de acordo com escores que variaram de leve a intenso. Não foram observados resultados divergentes entre os dois tipos de análise. No 5º. dia, independente do tipo de análise, constatou-se diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e o submetido à Fotobiomodulação ($p < 0,05$), embora tal efeito tenha sido considerado pequeno. **Conclusão:** Estes dados sugerem que ambos os métodos de análise foram capazes de reproduzir resultados semelhantes, cabendo ao pesquisador eleger aquele que melhor se adequa ao escopo de sua pesquisa.

Palavras-chave: Colágeno. Cicatrização. Laser Terapia

Abstract

Introduction: several studies highlighted the relevance of collagen in the context of wound healing, especially under the influence of different biomodulatory therapies. Collagen analysis has been performed using different methodological approaches, among which semi-quantitative and histomorphometric analyzes stand out. The present study aimed to compare the results of two methods of analysis regarding the presence of collagen fibers in the extracellular matrix during wound healing, in photobiomodulated wounds. **Methods:** twenty male Wistar rats were submitted to the induction of a standardized dorsal skin wound and divided into two groups, Control (GC) and Laser Photobiomodulated (GL). The periods of death corresponded to the 5th. and 10th. days. Histological sections were stained with Sirius red for semiquantitative and histomorphometric analysis of collagen. **Results:** two parameters were used to compare the primary outcome, a quantitative magnitude criterion in percentage (collagen area), and the second semiquantitative criterion, with magnitudes conferred according to scores that varied from mild to severe. No divergent results were observed between the two types of analysis. On the 5th. day, regardless of the type of analysis, there was a statistically significant difference between the control group and the group submitted to Photobiomodulation ($p < 0.05$), although this effect was considered small. **Conclusion:** these data suggest that both analysis methods were able to reproduce similar results, leaving the researcher to choose the one that best fits the scope of his research.

Keywords: Collagen. Wound Healing. Laser Therapy

INTRODUÇÃO

O colágeno é a proteína mais abundante no corpo humano e também é o principal componente da matriz extracelular dos tecidos. Já foram identificados vinte e nove tipos de colágeno, sendo que todos apresentam

Correspondente/Corresponding: *Alena Ribeiro Alves Peixoto Medrado – End: Av. Reitor Miguel Calmon s/n, Vale do Canela, 4º andar. Programa de Pós-Graduação dos Órgãos e Sistemas, Universidade Federal da Bahia. CEP 40.110-100. Salvador, Bahia, Brasil. – Tel: (+55) (71) 3257-8200 – E-mail: armedrado@ufba.br

uma estrutura terciária tripla-helicoidal, e, na maioria dos tecidos conjuntivos, se constituem parte integrante da rede de fibrilas organizadas espacialmente no interior da matriz extracelular (MEC), que resulta em uma estrutura tridimensional altamente especializada¹. O colágeno é formado por cadeias polipeptídicas dos aminoácidos glicina, prolina, lisina, hidroxilisina, hidroxiprolina e alanina, organizadas paralelamente em alfa-hélice, estabilizadas por pontes de hidrogênio e por ligações intermoleculares. A proteína apresenta em média 280 nm de comprimento e massa molecular de 300.000 Da².

No contexto do reparo tecidual, o colágeno é sintetizado por fibroblastos e sofre modificações ao longo do seu processo de biossíntese, a exemplo de reações de hidroxilação e glicosilação. A sua caracterização bioquímica, quantidade e padrão organizacional variam e determinam a resistência da cicatriz fibrosa final³. O colágeno é um componente estrutural importante nas diferentes fases do reparo tecidual. Na fase de hemostasia, a exposição do colágeno subendotelial resulta na ativação e agregação plaquetária, com consequente formação de coágulo constituído por uma rede de fibrina, no local da lesão. Já na fase inflamatória inicial, começa a ocorrer nova biossíntese de colágeno do tipo III, com arranjo mais delicado de fibrilas delgadas. Este é o tipo de colágeno predominante e se constitui o substrato para migração de células do sistema imune, com o propósito de conduzir, mediante cascatas de sinalização induzidas por citocinas pró-inflamatórias, a quimiotaxia de leucócitos, fibroblastos, células epiteliais e endoteliais. Durante a fase proliferativa, os fibroblastos, por sua vez, aumentam em número e intensificam o processo de biossíntese de colágeno tipo I e metaloproteinases da matriz (MMPs). Há crescente excitose de fatores de crescimento, que conduzem à angiogênese e à re-epitelização. Na fase mais avançada do reparo correspondente ao remodelamento, ocorre concomitante biossíntese e degradação das fibras colágenas e um aumento da resistência tênsil no leito da lesão em cicatrização⁴.

Diante da importância do colágeno na cicatrização e em muitos outros contextos, o estudo dessa proteína da matriz extracelular sob influência de diferentes terapias biomoduladoras como a ozonioterapia, a fotobiomodulação, o uso de fitoterápicos, entre outras, tem sido realizado por meio de diversas abordagens metodológicas. Um exemplo neste sentido, foi o estudo desenvolvido por Pires et al.⁵ (2021), no qual os autores demonstraram que o gás ozônio foi capaz de induzir maior biossíntese de colágeno em comparação ao grupo controle, através de análise quantitativa. Tal estudo, também evidenciou que o grupo biomodulado pelo ozônio, apresentou uma média significativamente maior de contração do tecido. Adicionalmente, Cunha et al.⁶ (2019), utilizaram a fotobiomodulação laser como terapia biomoduladora no reparo tecidual cutâneo de ratos e descreveram resultados semelhantes também mediante análise quantitativa. Contudo, outros métodos de análise do colágeno tem

sido descritos na literatura, geralmente em modelos experimentais relacionados ao reparo de variados tipos de tecido. Alvarenga et al.⁷ (2020), avaliaram o padrão organizacional das fibras colágenas em língua de ratos através de uma análise semiquantitativa. Os autores demonstraram que as lesões tratadas com óleo de copaíba apresentaram maior redução da ferida, menor grau de inflamação, e maior grau de re-epitelização. O grupo tratado com copaíba apresentou melhor padrão de organização de fibras colágenas em relação ao grupo controle. Adicionalmente, em um outro estudo, foi realizada análise histomorfométrica por meio da técnica de microscopia com luz polarizada para determinar o quantitativo de fibras colágenas na matriz extracelular⁸.

Em relação à fotobiomodulação laser (FL) ou terapia com laser de baixa intensidade (LLLT), esta surgiu como uma abordagem terapêutica de natureza biofísica, não invasiva e indolor, promissora para promover a aceleração da cicatrização de feridas através da redução da inflamação e dor⁹. Desde a sua utilização inicial há mais de 50 anos, tem aumentado o número de evidências científicas acerca do seu potencial de ação nas diferentes fases do reparo tecidual. Em estudo experimental, desenvolvido em 2008, Medrado et al.¹⁰, demonstraram que a utilização da fotobiomodulação laser foi responsável pela regressão do edema e diminuição do número de células inflamatórias no leito de ferimentos cutâneos padronizados em ratos Wistar. Ademais, tais autores relataram que no grupo de animais irradiados com laser de arseneto de gálio e alumínio de 607 nm, com dosimetria de 4 J/cm² por dia de aplicação, a realização de uma análise semiquantitativa do colágeno permitiu inferir que houve melhor padrão organizacional e compactação dos feixes de fibras colágenas recém-formadas, com diferenças estatisticamente significativas nos animais tratados com fotobiomodulação. Contudo, em outros estudos, tem crescido a opção pela análise do colágeno através de métodos mais objetivos, a exemplo da histomorfometria já citada¹¹.

Diante do exposto, o presente estudo objetivou analisar comparativamente dois métodos de análise de fibras colágenas que compreenderam respectivamente análise semiquantitativa e morfometria com aferição da área do colágeno em um modelo experimental de cicatrização cutânea *in vivo*, sob a ação da fotobiomodulação laser.

METODOLOGIA

Foram utilizados 20 ratos machos Wistar, com peso entre 150-300g do biotério da Faculdade Adventista da Bahia. Estes foram aleatoriamente divididos, através de sorteio, em 2 grupos de 10 ratos cada, os quais foram mortos 5 e 10 dias após os tratamentos propostos. O Grupo 1 correspondeu ao Grupo Controle (GC) e não recebeu nenhum tratamento, exceto o contato com a ponta ativa do laser desligado; O Grupo 2, denominado de Grupo Laser (GL) foi submetido à fotobiomodulação laser convencional por contato e emissão de luz.

Considerando que o desfecho primário do estudo fosse representado pela área do colágeno e que a menor diferença entre os grupos considerasse no grupo controle uma área aproximada de 10 μ m por campo e no grupo de animais submetidos à fotobiomodulação laser, 13 μ m por campo, com desvio padrão de 5, alfa de 5% e poder do estudo de 80%, estimou-se para a amostra 10 animais por grupo (WINPEPI (PEPI-for-Windows)).

Durante o experimento, os animais foram mantidos na Faculdade Adventista da Bahia (FADBA), em condições sanitárias de biotério convencional desta Instituição. O acondicionamento dos animais foi realizado em gaiolas individuais, etiquetadas, com chão coberto por maravalha. Os ratos foram mantidos em condições padrão de temperatura (22-25°C), umidade relativa (50-52%), com ciclos de luz-escuro por 12 horas, e expostos à luminosidade artificial doze horas por dia. A alimentação dos ratos foi feita com ração balanceada Nuvilah® (Suprilab) e água *ad libitum*. Foram adotados cuidados específicos com relação à limpeza e o ambiente protegido de estímulos auditivos para evitar o estresse.

Os animais foram submetidos à pesagem, anestesiados com Cloridrato de quetamina 10% (Dopalen®, São Paulo, Brasil) 75 mg/ml e cloridrato de xilazina 2% (Anazedan, São Paulo, Brasil) 5 mg/ml, com as dosagens de 2mg/kg e 3mg/kg respectivamente. Em seguida, efetuou-se a tricotomia dorsal e antisepsia com Iodopovidine (Rioquímica, São Paulo, Brasil). Foi realizada uma incisão circular na região dorsal com o auxílio de um bisturi circular metálico, também denominado de *punch*, (Biopsy Punch, Stiefel, Alemanha) com 6mm de diâmetro para a obtenção de uma ferida uniforme e padronizada, executada por um único operador devidamente calibrado.

Os ferimentos cutâneos dos ratos do Grupo Laser (GL) foram submetidos a 4 aplicações pontuais de 1 J/cm², com dosimetria total de 4 J/cm², por dia de aplicação. Utilizou-se um aparelho semiconductor de laser de arseneto de alumínio e gálio (AsAlGa, 9 mW, 670 nm, Laser de diodo de 0,031 W/cm²), com emissão contínua e área da ponta ativa de 0,28 cm² (Laser VR-KC-610- Dentoflex, Brasil). A dosimetria final foi de 12 J/cm² pois os ratos foram irradiados em 3 dias consecutivos após o procedimento cirúrgico.

Os animais foram submetidos à terapia biomoduladora descrita nos dias 1, 2 e 3 do estudo. O grupo controle foi submetido ao mesmo procedimento com o aparelho desligado. Cada grupo com 10 animais teve metade dos espécimes sacrificados no 5º dia e a outra metade no 10º dia. Após sedação profunda com a solução anestésica já descrita, os animais foram alocados em grupos na câmara de gás onde foi liberado gás carbônico em uma concentração de 5 litros por minuto.

Após a confirmação de morte, foi removida uma porção de tecido do dorso dos ratos que compreendia a ferida cirúrgica. O espécime foi fixado por um período mínimo de 18 horas, em solução de formol 10%, tamponado. Os fragmentos de pele contendo a lesão foram submetidos a cortes histológicos de 4 micrômetros de

espessura e corados com Sírius vermelho a fim de analisar a neocolagênese.

A captura das imagens das secções teciduais submetidas à coloração descrita foi realizada através do *software Motic Images Advanced 3.0*® (Motic China Group CO. LTD) no Laboratório de Bioquímica Oral do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia. Foi estabelecida uma área padrão para análise de todos os casos, a saber, 13107,200000 pixels. Cinco áreas padrão nos mesmos moldes já descritos foram obtidas para análise da neocolagênese em secções coradas com Sírius vermelho. Essas áreas foram documentadas nas regiões correspondentes aos bordos da úlcera, uma fotomicrografia de cada lado, e três áreas foram obtidas a partir da região central da derme subjacente à localização da úlcera cutânea. Cada fotomicrografia foi obtida com o aumento de 40x e salva em formato JPEG para realização da mensuração da área total do colágeno em μ m². Foi calculada uma média aritmética em micrômetros, de acordo com o estudo de Miot, Brianezi¹² (2010).

A presença do colágeno na derme foi também avaliada através de análise semiquantitativa de acordo com os critérios por Alvarenga et al.⁷ (2020). As fibras colágenas foram classificadas através de três escores: 1. fibras colágenas finas, delicadas, frouxamente organizadas vistas em toda a área da ferida; 2. fibras colágenas finas, delicadas frouxamente organizadas em algumas áreas e mais espessas e grossas em outras áreas da ferida e 3. fibras colágenas espessas, grossas e densamente organizadas vistas em toda a área da ferida.

Foram obtidas as estatísticas descritivas: proporção para a variável escala e mediana mais percentis 25 e 75 para a variável área de acordo com os grupos independentes de intervenção, 2 a 2.

Para se verificar a associação entre os grupos de intervenção e a escala utilizou-se a medida de associação do tipo *d*, delta de Somers, devido à natureza qualitativa ordinal da variável escala, juntamente com o valor de *p* oriundo do teste exato de Fisher. Para se verificar o grau de associação entre os grupos de intervenção e a variável dependente área realizou-se a medida de associação do tipo *d* construída a partir da estatística U de Mann-Whitney¹³, assim como calculou-se o valor de *p* a partir do teste de Mann-Whitney, 2 a 2, para grupos independentes.

O critério adotado para a verificação da força de associação para as medidas tipo *d* baseou-se em pontos de corte genéricos usados internacionalmente: [0-0,41]: ausente; [0,41-1,15]: pequena; [1,15-2,70]: moderada; > 2,70: grande¹⁴.

Os dados foram analisados no pacote estatístico R¹⁵.

RESULTADOS

No período de 5 dias, a análise semiquantitativa das secções teciduais coradas com Sírius vermelho, revelou no GC, um padrão de desorganização de fibras colágenas recém-formadas nas áreas correspondentes aos bordos

Análise quanti e semiquantitativa do colágeno no reparo tecidual
- um estudo comparativo

do ferimento cutâneo padronizado, logo abaixo do tecido epitelial em formação, enquanto que no grupo submetido à fotobiomodulação, as fibras de colágeno se apresentavam de forma organizada, mais espessas e grossas em algumas áreas do ferimento ($p=0,047$); (Tabela 1). A tabela 2 ilustra os valores da análise quantitativa da área do colágeno em cada secção histológica. Foi observada diferença estatisticamente significativa também no período de 5 dias ($p=0,15$). O efeito da Fotobiomodulação entre os grupos Controle e Laser (0,83) foi considerado “pequeno” (Tabela 3).

No décimo dia, a análise semiquantitativa evidenciou, tanto no GC quanto no GL, fibras colágenas mais finas e frouxamente organizadas em algumas áreas, e em outras, fibras mais espessas e organizadas ($p=1,0$); (Tabela 1). A análise quantitativa da área das fibras colágenas, neste período demonstrou ser maior no GL, embora não tenha sido estatisticamente significativa ($p=1,0$); (Tabela 2). O efeito da Fotobiomodulação entre GC e GL (0,03), neste período, foi considerado “ausente” (Tabela 3).

Tabela 1 - Medianas e intervalos interquartílicos calculados a partir da análise semiquantitativa, em função do grupo experimental e tempo de análise.

Grupo	Tempo (dias)	
	5	10
	Mediana (Quartis)	Mediana (Quartis)
GC	1 (1 - 1)	2 (2 - 3)
GL	2 (1 - 2)*	2 (2 - 2)

* $p<0,05$.

Tabela 2 – Medianas e intervalos interquartílicos calculados a partir da análise quantitativa, em função do grupo experimental e tempo de análise.

Grupo	Tempo (dias)	
	5	10
	Mediana (Quartis)	Mediana (Quartis)
GC	20,603 (16,988 - 23,159)	25,713 (20,750 - 27,628)
GL	23,460 (22,170 - 28,286)*	30,135(20,520 - 32,004)

* $p<0,05$.

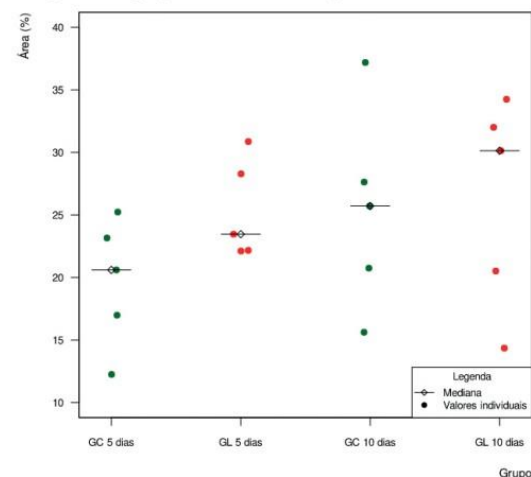
Tabela 3 - Tamanho dos efeitos de acordo com as análises realizadas, em função do grupo experimental e tempo de análise.

	Grupo/Tempo	Efeito	Qualificação do efeito	Valor de p
Análise semiquantitativa	GCS X GL5	0,83	Efeito pequeno	0,047
	GC10 X GL10	0,56	Efeito pequeno	1
Análise quantitativa	GCS X GL5	0,5	Efeito pequeno	0,150
	GC10 X GL10	0,03	Efeito ausente	1

Critério para tamanho do efeito - [0-0,41]: Ausente; [0,41-1,15]: Pequena; [1,15-2,70]: Moderada; > 2,70: Grande.

A figura 1 ilustra os valores observados na análise quantitativa da área da ferida em medianas e quartis, em ambos os grupos experimentais nos dois períodos do estudo.

Figura 1 – Gráfico de dispersão das medianas das áreas de colágeno, dos grupos GC e GL nos tempos de 5 e 10 dias.



DISCUSSÃO

Durante o reparo tecidual, a neocolagênese representa um evento crítico, pois determinará a força tênsil do novo tecido em formação¹⁶. Neste contexto, diferentes métodos de análise do colágeno têm sido propostos na literatura. De forma geral, as análises semiquantitativa e quantitativa representam os tipos mais usuais de métodos para o estudo do colágeno. Em estudo realizado por Cunha et al.⁶ (2019), sobre os efeitos de diferentes protocolos de laserterapia sob a biossíntese de colágeno em feridas, a análise quantitativa realizada demonstrou uma deposição de colágeno maior no grupo fotobiomodulado com laser (irradiado com 16 J/cm² diariamente) em comparação aos grupos controle. Por outro lado, no estudo semiquantitativo realizado por Freitas et al.¹⁷ (2021), foram atribuídas

categorias para avaliar a presença de fibras colágenas na matriz extracelular, as quais foram definidas como “leve” (escore 1), “moderada” (escore 2) e “intensa” (escore 3). Foi constatado que o grupo fotobiomodulado apresentou escores mais altos em relação ao grupo controle. Embora, tais estudos tenham utilizado diferentes abordagens metodológicas para avaliar o mesmo desfecho, os resultados foram semelhantes no tocante à superioridade dos efeitos descritos nos grupos tratados com Fotobiomodulação.

No presente estudo de caráter comparativo, observou-se que, independente do método de análise utilizado, a saber semiquantitativo ou histomorfométrico, os resultados encontrados em ambas as análises demonstraram similaridade, inclusive no que diz respeito à existência de diferença estatisticamente significativa, em especial, no 5º dia do período pós-operatório. A análise semiquantitativa apresentou escores superiores para o grupo laser em relação ao grupo controle e, em correspondência, a análise quantitativa demonstrou o mesmo resultado em mediana para área de colágeno, no mesmo período. Contudo, no 10º dia, ambas as análises não evidenciaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais no tocante à presença de colágeno.

Nos últimos anos, tem sido observada uma tendência à realização de estudos que utilizaram análise quantitativa. De fato, há na literatura crescente valorização de estudos quantitativos que tem investigado diferentes variáveis do reparo tecidual, a exemplo da expressão de colágeno¹⁸. O presente estudo objetivou verificar a existência ou não de uma possível correspondência entre dois tipos diferentes de análise do colágeno em um modelo experimental clássico de cicatrização cutânea sob a influência da Fotobiomodulação. A realização de estudos de caráter experimental com o objetivo de analisar os efeitos teciduais induzidos pela Fotobiomodulação tem aumentado nos últimos anos¹⁷. De fato, diferentes variáveis do reparo tecidual, como intensidade da inflamação, densidade vascular, neocolagênese, e re-epitelização, entre outras, têm sido documentadas tanto através de análises quanti como semiquantitativas¹⁹.

Segundo Lopez, Brundage²⁰ (2019), os efeitos anti-inflamatórios e bioestimuladores da Fotobiomodulação podem ser atribuídos a uma reação fotoquímica na área da ferida. Os autores sugerem que o mecanismo principal seja representado pela absorção dos fótons emitidos pelo Laser por parte dos cromóforos presentes nas mitocôndrias das células que integram o microambiente da lesão, gerando um estímulo para síntese de adenosina trifosfato (ATP), bem como uma redução dos níveis de espécies reativas de oxigênio. Em associação à redução da inflamação, a dor também seria atenuada. Embora não tenha sido objetivo do presente estudo analisar as variáveis da fase inflamatória do reparo sob a influência da fotobiomodulação, a sua realização ratificou os achados de outros autores publicados na literatura que demonstraram aumento da expressão de colágeno na matriz extracelular relacionado ao uso da fotobiomodulação^{21,22}.

Urge destacar a existência de grande heterogeneidade de nos parâmetros relatados nos estudos que avaliaram o potencial terapêutico da Fotobiomodulação, tais como o tipo do laser, a frequência de tratamento, a densidade de potência e de energia, assim como o tempo de aplicação²³. Quanto ao intervalo de tempo das análises da evolução do reparo, percebe-se similar heterogeneidade na literatura, haja vista a documentação de estudos que utilizaram diferentes períodos de análise, como 5, 10 e 15 dias Prabhu et al.²⁴ (2020), assim como intervalos de 7, 14 e 21 dias Cunha et al.⁶ (2019), e ainda tempos mais prolongados como os descritos por Medrado et al.¹⁰ (2008), como 3, 7, 10, 15, 20, 30 e 60 dias. Tais estudos apontam para um comportamento semelhante de parâmetros de análise após o dia 7, tanto entre os grupos que receberam fotobiomodulação quanto os grupos controle, o que sugere uma atuação mais impactante da fotobiomodulação laser nas fases mais iniciais do processo de reparo. Achados semelhantes foram observados no presente estudo, pois a partir do 10º dia do período pós-operatório não foram constatadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos estudados, independente do tipo de análise realizada.

Uma possível explicação para a constatação de diferenças estatisticamente significativas nos períodos iniciais pode ser atribuída ao potencial de oxir-redução da Fotobiomodulação laser na fase inflamatória bem como na fase proliferativa, pois tal terapia pode estimular resolução mais rápida do edema e células inflamatórias, assim como estimular a proliferação celular através do aumento da produção de fatores de crescimento no leito do ferimento e dessa forma, acelerar o fechamento da ferida²⁰.

Cabe ressaltar que o presente estudo apresenta algumas limitações, pois os nossos resultados demonstraram que apesar de existir diferença estatisticamente significativa quanto à variável colágeno entre os dois grupos experimentais, o seu efeito foi considerado pequeno ou ausente a depender do tipo de análise. Provavelmente, o pequeno número de animais e a proximidade dos períodos de sacrifício dos animais podem ter interferido nos resultados obtidos a partir da análise estatística realizada.

CONCLUSÃO

A presente investigação realizou um estudo comparativo entre dois métodos de avaliação da presença de fibras colágenas na matriz extracelular durante o reparo tecidual sob a influência da Fotobiomodulação laser, representados pelas análises semiquantitativa e histomorfométrica. Independente do tipo de análise realizada, os resultados foram semelhantes e evidenciaram diferença estatisticamente significativa entre o grupo fotobiomodulado e o controle no 5º. dia do período pós-operatório. Estes dados sugerem que ambos os métodos de análise foram capazes de reproduzir resultados semelhantes, cabendo ao pesquisador eleger aquele que melhor se adequa ao escopo de sua pesquisa.

Análise quanti e semiquantitativa do colágeno no reparo tecidual
- um estudo comparativo

REFERÊNCIAS

1. Chattopadhyay S, Raines RT. Collagen-based biomaterials for wound healing. *Biopolymers*. 2014 Aug; 101(8):821-33. doi:10.1002/bip.22486
2. Wang H. A review of the effects of collagen treatment in clinical studies. *Polymers*. 2021; 13:3868. doi: <https://doi.org/10.3390/polym13223868>
3. Silva TF, Penna ALB. Colágeno: características químicas e propriedades funcionais. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2012;71(3):530-9.
4. Mathew-Steiner SS, Roy S, Sen, CK. Collagen in Wound Healing. *Bioengineering* 2021;8: 63. doi: <https://doi.org/10.3390/bioengineering8050063>
5. Pires JR, Karam AM, Garcia VG, Ribeiro FS, Pontes AEF, Andrade CR, et al. Effect of systemic ozone therapy as a biomodulator of tissue regeneration and inflammatory response in rats. *Rev Odontol UNESP*. 2021;50:e20210046. doi: <https://doi.org/10.1590/1807-2577.04621>
6. Cunha JLS, Carvalho FMA, Filho RNP, Ribeiro MAG, Albuquerque-Junior RLC. Effects of different protocols of low-level laser therapy on collagen deposition in wound healing. *Braz Dent J [online]*. 2019 [accessed 2022 Nov 17];30(4):317-24. Available from: <https://doi.org/10.1590/0103-6440201902400>. doi: <https://doi.org/10.1590/0103-6440201902400>.
7. Alvarenga MOP, Bittencourt LO, Mendes PFS, Ribeiro JT, Lameira OA, Monteiro MC, et al. Safety and Effectiveness of Copaiba Oleoresin (*C. reticulata* Ducke) on Inflammation and Tissue Repair of Oral Wounds in Rats. *Int J Mol Sci*. 2020 May 18;21(10):3568. doi: 10.3390/ijms21103568.
8. Bedoya SÃO, Souza MV, Conceição LG, Vitoria MIV, Valente FL, Loures FH, et al. Quantificação do colágeno dérmico equino por duas técnicas morfométricas: contagem de pontos e segmentação de cor. *Arq Bras Med Vete Zootec [online]*. 2019 [acesso em 2022 Nov 17];71(3): 761-9. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1678-4162-10487>. doi: <https://doi.org/10.1590/1678-4162-10487>.
9. Keshri GK, Gupta A, Yadav A, Sharma SK, Singh SB. Photobiomodulation with Pulsed and Continuous Wave Near-Infrared Laser (810 nm, Al-Ga-As) Augments Dermal Wound Healing in Immunosuppressed Rats. *PLoS ONE*. 2016;11(11):e0166705. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166705>
10. Medrado AP, Soares AP, Santos ET, Reis SR, Andrade ZA. Influence of laser photobiomodulation upon connective tissue remodeling during wound healing. *J Photochem Photobiol B*. 2008 Sept 18;92(3):144-52. doi:10.1016/j.jphotobiol.2008.05.008.
11. Tabakoglu HO, Sani MM, Uba AI, Abdullahi UA. Assessment of circular wound healing in rats after exposure to 808-nm laser pulses during specific healing phases. *Lasers Surg Med*. 2016; 48:409-15. doi: <https://doi.org/10.1002/lsm.22462>
12. Miot HA, Brianezi G. Análise morfométrica do colágeno dérmico a partir da segmentação por conglomerados (clusters) de cor. *Anais Brasileiros de Dermatologia [online]*. 2010;85(3):361-4. doi: <https://doi.org/10.1590/S0365-05962010000300010>.
13. Grissom RJ, Kim JJ. Effect sizes for research: univariate and multivariate applications. Second Ed. New York: Routledge; 2012
14. Ferguson CJ. An effect size primer: A guide for clinicians and researchers. *Professional Psychology: Research and Practice*. 2009;40(5):532-38.
15. R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, AustriaR: Foundation for Statistical Computing; 2022. [accessed 2022 Nov 17]; Available from: <http://www.R-project.org>.
16. Souza PGC, Castro MS, Silva LP. A Biologia da proliferação fibroblástica: a excessiva deposição extracelular de colágeno durante o reparo de lesões na pele / The Biology of fibroblastic proliferation: excessive extracellular collagen deposition during skin injury repair. *Braz J Devel*. 2021;7(3):28989-9010. doi: <https://doi.org/10.34117/bjdv7n3-560>
17. Freitas KABS, Minicucci EM, Lima TO, Silva KAB, Menozzi BD, Silva VFB, et al. Efeitos da fotobiomodulação (laser de baixa intensidade) na cicatrização de feridas: revisão integrativa. *Res Soc Devel*. 2021;10(11):e362101119821. doi: 10.33448/rsd-v10i11.19821.
18. Mélo DC, Marcos RL. Terapia por fotobiomodulação modula a organização tecidual e manutenção das propriedades mecânicas em modelo experimental de lesão cutânea. [tese] São Paulo: Universidade Nove de Julho; 2021. [acesso em 2022 Nov 17]. Disponível em: <http://bibliotecatede.uninove.br/handle/tede/2879>
19. Graneiro TS, Rocha CR, Carvalho LRD. Tratamento de feridas usando laser de baixa intensidade como terapia adjuvante: uma revisão integrativa da literatura. *Res Soc Dev*. 2022;11(11):e84111133276. doi: 10.33448/rsd-v11i11.33276.
20. Lopez A, Brundage C. Wound photobiomodulation treatment outcomes in animal models. *J Vet Med*. 2019. doi: <https://doi.org/10.1155/2019/6320515>.
21. Dantas JbDL, Martins GB, Lima HR, Carrera M, Reis SRda, Medrado ARAP. Evaluation of preventive laser photobiomodulation in patients with head and neck cancer undergoing radiochemotherapy: Laser in patients with head and neck cancer. *Spec Care Dentist*. 2020;40: 364- 73. doi: <https://doi.org/10.1111/scd.12486>
22. Costa TF, Medrado ARAP. Efeito biomodulador do laser de baixa potência sobre a densidade vascular e fibroplasia [dissertação]. 2016. [acesso em 2022 Nov 17]; Disponível em: <https://repositorio.bahiana.edu.br:8443/jspui/handle/bahiana/746>.
23. Leal CT, Bezerra AdL, Lemos A. Efetividade do laser de HeNe 632,8 nm no reestabelecimento da integridade dos tecidos cutâneos em animais experimentais: revisão sistemática. *Fisioter Pesq [online]*. 2012;19(3):290-6. doi: <https://doi.org/10.1590/S1809-29502012000300016>.
24. Prabhu V, Rao BSS, Rao ACK, Prasad K, Mahato KK. Photobiomodulation invigorating collagen deposition, proliferating cell nuclear antigen and Ki67 expression during dermal wound repair in mice. *Lasers Med Sci*. 2022;37:171-80. doi: <https://doi.org/10.1007/s10103-020-03202-z>

Submetido em: 22/11/2022

Aceito em: 30/11/2022

Apêndice B – Artigo intitulado “Detecção de SARS-CoV-2 na Saliva e em Glândulas Salivares – Uma Revisão Sistemática” aceito na Research, Society and Development

Detecção de SARS-CoV-2 na Saliva e em Glândulas Salivares – Uma Revisão Sistemática

Detection of SARS-CoV-2 in Saliva and Salivary Glands – A Systematic Review

Detección de SARS-CoV-2 en saliva y glándulas salivales- Una Revisión Sistemática

Recebido: 00/01/2022 | Revisado: 00/01/2022 | Aceito: 00/01/2022 | Publicado: 00/01/2022

Lavínia Bonfim Sampaio

<https://orcid.org/000-0002-1042-7070>

Estudante de odontologia da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Brasil.

E-mail: laviniasampaio18.2@bahiana.edu.br

Bruna Carvalho Lopez Moreno

ORCID: <https://orcid.org/000-00002-7936-1970>

Estudante de odontologia da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Brasil.

E-mail: brunamoreno20.1@bahiana.edu.br

Anildo Alves de Brito Junior

ORCID: <https://orcid.org/000-0002-7752-3104>

Graduação em Odontologia pela Faculdade Adventista da Bahia, Brasil.

E-mail: junioranildo02@gmail.com.

Flávia Quadros Lima

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9269-1037>

Mestranda em Medicina e saúde Humana na Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Brasil.

E-mail: flaviaquadros.pos@bahiana.edu.br

Juliana Borges de Lima Dantas

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9798-9016>

Professora assistente da da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública e da Faculdade Adventista da Bahia, Brasil.

E-mail: julianadantas.pos@bahiana.edu.br.

Alena Ribeiro Alves Peixoto Medrado

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4074-4680>

Doutora em patologia humana, professora adjunta da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Brasil.

E-mail: apmedrado@bahiana.edu.br

Resumo

No início da pandemia de COVID-19 foi observado que o contato com a saliva infectada representava uma forma de contágio possivelmente relacionada com a proximidade anatômica entre o trato respiratório superior e a cavidade oral. Estudos recentes indicam que o SARS-COV-2 pode infectar células epiteliais das glândulas

salivares, o que impacta na prática clínica de cirurgiões-dentistas. O presente trabalho objetivou coletar evidências acerca da presença de SARS-CoV-2 em glândulas salivares, da sua detecção por meio da saliva e discutir a relevância deste conhecimento na prática clínica odontológica. Foi realizada uma revisão sistemática com busca nas bases de dados Pubmed, Lilacs, Google Scholar, Scielo, Cochrane e Medline, no período entre novembro/2020 a maio/2021. Foram adotadas as diretrizes PRISMA e o anagrama PICO para caracterização dos estudos de acordo com os critérios de inclusão, que compreenderam estudos prospectivos sobre a temática, com texto completo online disponível em inglês ou português, e publicados a partir de 2020. Entre os 17 artigos selecionados, 2 estudos prospectivos avaliaram a presença de SARS-CoV-2 no parênquima de glândulas salivares e todos os 16 trabalhos constataram a presença de SARS-CoV-2 na saliva. O tamanho da amostra variou de acordo com o tipo de estudo, e o total de participantes foi 3677. Este estudo ratifica a saliva como uma via de transmissão e, sendo assim, é crucial que todos os profissionais de saúde utilizem os equipamentos de proteção individual e tenham rigor com as normas de biossegurança.

Palavras-chave: Covid-19; Glândula salivar; Saliva e Infecção.

Abstract

At the beginning of the COVID-19 pandemic, contact with the saliva infected was observed to represent a form of contagion possibly related to the anatomical proximity between the upper respiratory tract and the oral cavity. Studies seem to indicate that SARS-COV-2 can infect epithelial cells of the salivary glands, and impacts the clinical practice of dental surgeons. This study aimed to collect current evidence on the presence of SARS-CoV-2 in salivary glands, its detection through saliva, and discuss the relevance of this knowledge in clinical dental practice. A systematic review was conducted in the databases Pubmed, Lilacs, Google Scholar, Scielo, Cochrane and Medline in the period from November/2020 to May/2021. PRISMA guidelines and the anagram PICO were adopted to characterize the selected studies according to the inclusion criteria, which comprised prospective studies, with full text available online in the English or Portuguese language and published from the year 2020. Among the 17 selected articles, 2 prospective studies evaluated the presence of SARS-CoV-2 in the parenchyma of salivary glands and all 16 papers found the presence of SARS-CoV-2 in saliva. The size of the studies varied according to the type of study, and the total number of participants was 3677. This study ratifies saliva as a route of transmission, and it is crucial that all health care workers use personal protective equipment and adhere strictly to biosafety regulations.

Keywords: Covid-19; Salivary gland; Saliva and Infection.

Resumen

Ya la pandemia de COVID-19 se observó que el contacto con la saliva infectada representaba una forma de contagio relacionada con la proximidad anatómica entre el tracto respiratorio superior y la cavidad oral. Estudios indicar que el SARS-COV-2 puede infectar las células epiteliales de las glándulas salivales, con un

profundo impacto en la práctica clínica de los cirujanos dentales. Este estudio tenía como objetivo recopilar las pruebas sobre la presencia del SARS-CoV-2 en las glándulas salivales, su detección a través de la saliva y discutir la relevancia de estos conocimientos en la práctica clínica dental. Esta revisión sistemática se realizó una búsqueda en las bases de datos Pubmed, Lilacs, Google Scholar, Scielo, Cochrane y Medline en el periodo entre noviembre/2020 y mayo/2021. Se adoptaron las directrices PRISMA y el anagrama PICO para caracterizar los estudios según los criterios de inclusión, que comprendían estudios con texto completo disponible en inglés y portugués, publicados a partir del año 2020. Entre los 17 artículos seleccionados, 2 estudios evaluaron la presencia de SARS-CoV-2 en el parénquima de las glándulas salivales y los 16 trabajos encontraron la presencia de SARS-CoV-2 en la saliva. El tamaño de la muestra variaba según el tipo de estudio, y el número total de participantes era de 3.677. Este estudio ratifica que la saliva es una vía de transmisión y, por lo tanto, es crucial que todos los profesionales sanitarios utilicen equipos de protección personal y cumplan rigurosamente las normas de bioseguridad.

Palabras clave: Covid-19; Glándula salival; Saliva y Infección.

1. Introdução

A pandemia do coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-Cov-2), originada em Wuhan, província da China, em dezembro de 2019, gerou grande preocupação na comunidade científica internacional, não só em razão de sua alta transmissibilidade, mas também por estar associada a uma considerável taxa de mortalidade. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), na atualização operacional semanal sobre a COVID-19 de 28 de janeiro de 2022, foram confirmados 364.191.494 de casos, e 5.631.457 mortes (OMS, 2022). Neste momento, faz-se necessário ampliar o conhecimento acerca da doença, bem como do seu controle e uma possível profilaxia, através de uma abordagem vacinal eficaz.

A magnitude desta pandemia está relacionada primariamente ao fato de sua transmissão se dar por gotículas de saliva e também pelas secreções respiratórias. Segundo Azzi et al. (2020), há evidência da presença de altos títulos do coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2) na saliva e nas secreções das vias respiratórias que chegam até a cavidade oral através do reflexo da tosse.

Segundo Benvenuto et al. (2020), Huang et al. (2020) e Chen et al. (2020), o SARS-CoV-2 é semelhante, em alguns aspectos estruturais e de comportamento biológico, a outros coronavírus já isolados, a exemplo do SARS-CoV-1 de 2002 e do MERS, de 2012. De acordo com Hoffman et al. (2020), devido à similaridade entre tais vírus, o SARS-CoV-2 utiliza a mesma via de entrada nas células humanas que o SARS-CoV-1, que se dá através da interação do patógeno a um receptor de membrana denominado angiotensina-convertease II (ACE2). Além dessa via de sinalização, Hoffman et al. (2020), evidenciaram que as espículas do envelope do SARS-CoV-2 podem se ligar também a uma serina protease transmembranar 2 (TMPRSS2) presente na membrana da célula hospedeira

para a ativação de proteína S. O receptor ACE2 e a serina protease TMPRSS2 são essenciais para o vírus estabelecer uma interação com a superfície da proteína S e para se fundir à membrana com consequente entrada na célula hospedeira (Burgueño-Rodrigues et al., 2020). Tanto a ACE2 quanto a TMPRSS2 estão presentes em diversos tipos celulares do corpo humano. A TMPRSS2 tem sido expressa por células endoteliais (Kumar et al., 2020), além de ser também altamente expressa nas glândulas pituitária e próstata (Song et al., 2020). Por outro lado, a ACE2 está expressivamente presente nas células dos alvéolos pulmonares, nos rins, na mucosa oral (Xu et al., 2020), testículos, intestino delgado e tecido adiposo (Song et al., 2020) e células endoteliais de vasos sanguíneos e capilares (Kumar et al., 2020). Evidência mais recente também indica que ambos os receptores, ACE2 e TMPRSS2, são significativamente expressos nas células epiteliais da mucosa oral e das glândulas salivares (Song et al., 2020).

Em um estudo experimental com ratos, Song et al. (2020), constataram que a considerável expressão da ACE2 e TMPRSS2 na membrana das células ductais e acinares de glândulas salivares, parece sugerir que o vírus pode se reproduzir no interior destas e essa localização anatômica poderia representar um sítio de replicação viral ativo alternativo aumentando a carga viral na saliva, além daqueles presentes nas células do aparelho respiratório.

Diante do exposto, tem aumentado o interesse por esse possível reservatório a fim de compreender melhor a patogênese da infecção pelo SARS-CoV-2. Em especial, esse conhecimento será relevante para os cirurgiões-dentistas, haja visto que estes profissionais lidam diretamente com a cavidade oral. Muitas vezes, os cirurgiões-dentistas entram em contato com portadores assintomáticos que podem apresentar uma carga viral significativa na mucosa oral e na saliva em razão da possível replicação viral no interior das glândulas salivares. Este aspecto já foi previamente documentado por Wang et al. (2004). Tais autores demonstraram que o SARS-CoV-1 pode ser detectado na saliva antes mesmo de existirem lesões nos pulmões.

A presente revisão sistemática objetivou compilar evidências científicas atuais acerca da presença de SARS-CoV-2 em glândulas salivares e na saliva e discutir a relevância deste conhecimento na prática clínica odontológica.

2. Metodologia

2.1 Desenho do estudo

Tratou-se de uma revisão sistemática qualitativa que foi elaborada de acordo com a metodologia PRISMA (Principais Itens para relatar Revisões sistemáticas e Meta-análises). Este estudo foi submetido à plataforma PROSPERO, com número de registro CRD42021235096 e objetivou responder à seguinte pergunta central: “Quais são as evidências científicas da presença de SARS-CoV-2 na saliva não aspirada e no parênquima de glândulas salivares?”

2.2 Estratégia de Busca

Foi realizada uma busca por estudos publicados em revistas científicas indexadas, nas bases de dados eletrônicas Scielo, Pubmed, Cochrane, BVS (Biblioteca Virtual em Saúde) e Google Acadêmico. O período de busca compreendeu os meses de novembro de 2020 a maio de 2021. Foram utilizados os seguintes descritores especificados no DeCS/MESH "Glândulas Salivares", "Saliva", "COVID-19" e "SARS-CoV-2" e seus correspondentes na língua inglesa, "Salivary Glands", "Saliva", "Covid-19" e "SARS-CoV-2", através das seguintes combinações: "Glândulas Salivares E Covid-19", "Glândulas Salivares E SARS-CoV-2", "Glândulas Salivares E Covid-19 E SARS-CoV-2", "Saliva E Covid-19", "Saliva E SARS-CoV-2", "Saliva E Covid-19 E SARS-CoV-2", "Salivary Glands AND Covid-19", "Salivary Glands AND SARS-CoV-2" e "Salivary Glands AND Covid-19 AND SARS-CoV-2", "Saliva AND Covid-19", "Saliva AND SARS-CoV-2" e "Saliva AND Covid-19 AND SARS-CoV-2".

2.3 Critérios de Elegibilidade

Os critérios de inclusão compreenderam estudos de acurácia diagnóstica e prospectivos, incluindo estudos de corte transversal, coorte, ensaios clínicos randomizados e não randomizados, que avaliaram a COVID-19 e possível presença do SARS-CoV-2 na saliva não expectorada e em glândulas salivares. Os manuscritos selecionados deveriam estar disponíveis online, sob a forma de texto completo, nos idiomas português e inglês e publicados a partir do ano de 2020. Os artigos publicados em anos anteriores, revisões de literatura, relatos de caso clínico e aqueles que fugissem à temática proposta, não foram incluídos na presente revisão. Estudos que contemplaram a análise da saliva estimulada por tosse ou expectorada, não foram incluídos na presente revisão.

Os artigos selecionados de acordo com os critérios de inclusão e não inclusão foram analisados independentemente por dois avaliadores. Quaisquer divergências entre estes foram resolvidas por consenso. O nível de concordância entre os dois autores revisores foi avaliado através do índice Cohen kappa, com valor 0,95.

2.4 Análise de Qualidade

Os dados referentes à população, objetivo, metodologia, ano, tipo do estudo, resultados e desfecho foram extraídos independentemente pelos dois avaliadores e sumarizados em uma tabela descritiva desenvolvida especialmente para esta revisão sistemática. A escala de qualidade STROBE (Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology) também foi utilizada, atribuindo uma classificação para cada item da escala: item totalmente atendido, parcialmente atendido/ Conformidade do item não está claro. Aqueles que atenderam aos critérios de qualidade nesta revisão sistemática tiveram pelo menos 17 itens classificados como total ou parcialmente atendidos.

2.5 Extração de Dados

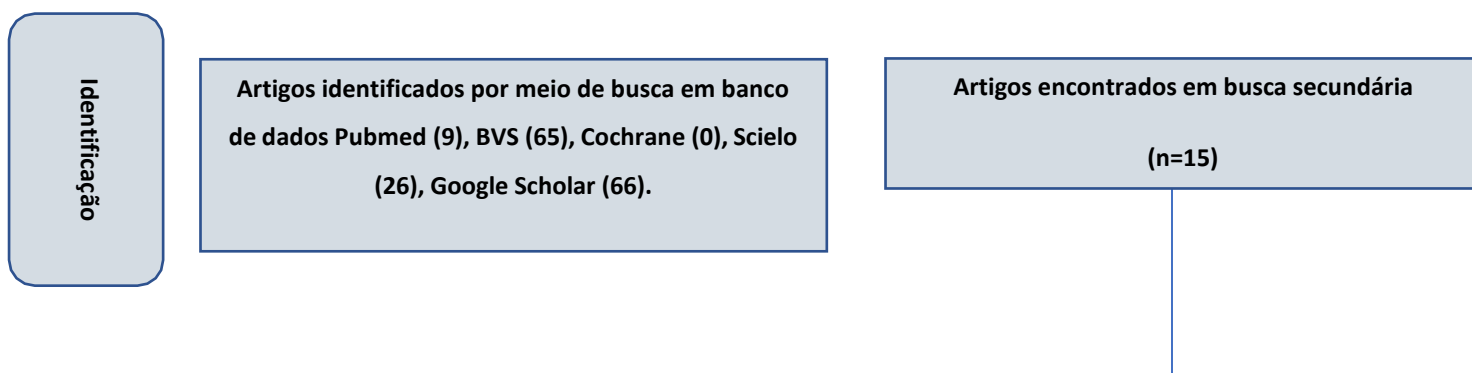
Para a extração dos dados dos estudos utilizou-se o anagrama PICO, onde foi definida a população de indivíduos com suspeita de infecção pelo SARS-CoV-2; a intervenção incluiu a realização de exames laboratoriais para detecção do SARS-CoV-2 na saliva e em glândulas salivares; foram considerados controles aqueles sem infecção; e o desfecho foi a detecção do vírus na saliva e/ou no parênquima de glândulas salivares.

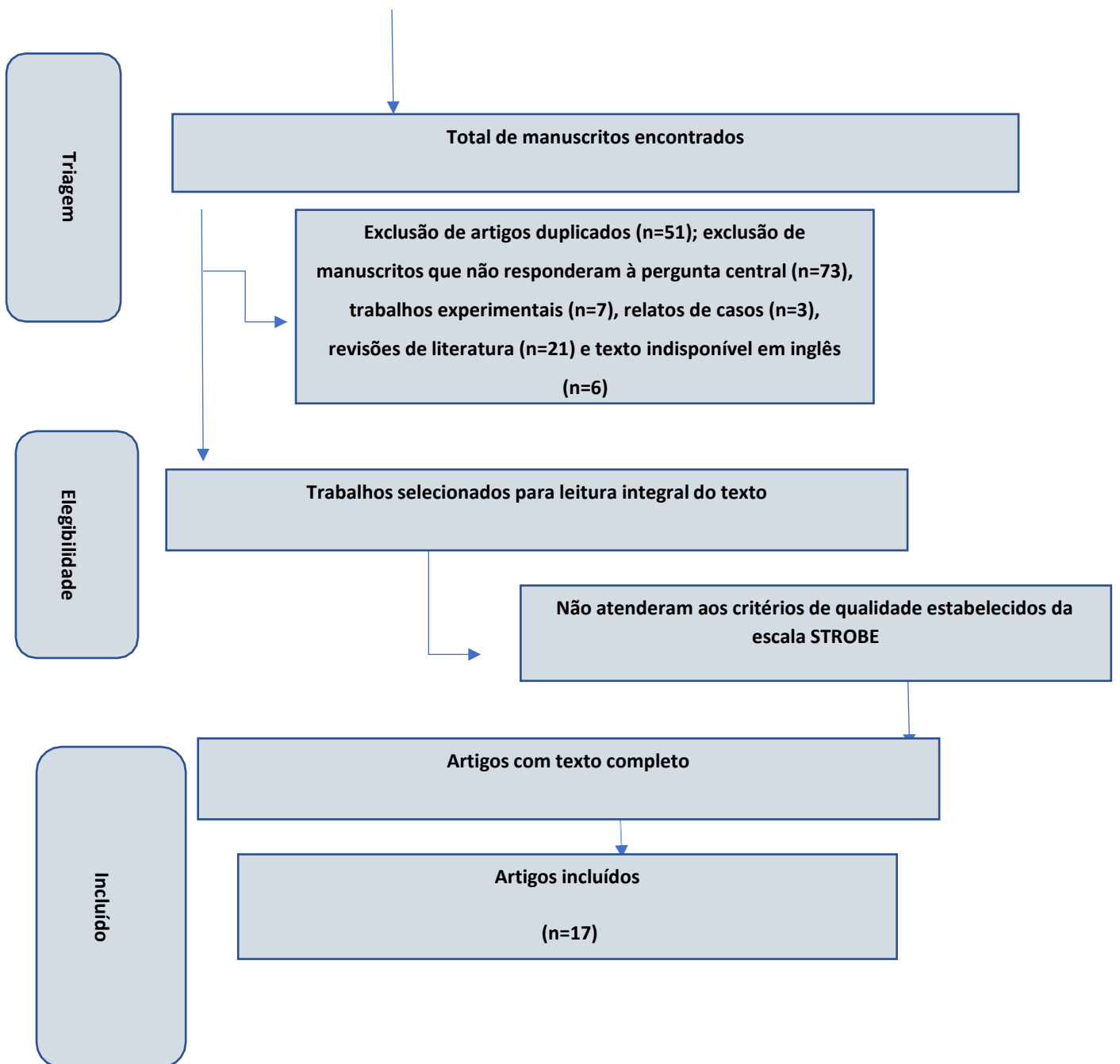
2.6 Estratégia de Síntese de Dados

Os dados foram sintetizados pelo método de síntese temática. Foi realizada análise da heterogeneidade clínica e da heterogeneidade metodológica dos manuscritos por meio do teste de heterogeneidade. Todos os dados foram resumidos em uma tabela descritiva e qualitativa desenvolvida especialmente para esta revisão sistemática.

3. Resultados

Inicialmente, foram identificados 163 artigos por meio de pesquisa nas seguintes bases de dados online seguindo a estratégia de busca: 9 no Pubmed, 65 no BVS, 26 no Scielo e 63 no Google acadêmico. Além disso, foi realizada uma busca ativa para outros estudos citados nas referências dos artigos identificados no primeiro levantamento, que culminou na inclusão de mais 15 estudos. No processo de triagem, 51 artigos duplicados foram excluídos. Cento e dez estudos foram excluídos após a leitura dos títulos e resumos segundo as seguintes justificativas: 73 não responderam à pergunta central, 7 eram estudos experimentais, 3 relatos de caso clínico, 21 revisões de literatura e 6 não possuíam texto disponível em inglês. Após todas as etapas de refinamento, 17 artigos foram selecionados e considerados elegíveis. O fluxograma 1 ilustra a estratégia de busca.





Fluxograma 1 - Estratégia de busca dos artigos de acordo com os critérios de inclusão. Período de busca: Novembro de 2020 até Maio de 2021. Salvador, Bahia.

Com relação à análise da qualidade metodológica dos artigos incluídos, optou-se por selecionar aqueles com pontuação acima de 70% na escala STROBE.

		ESCALA STROBE - PONTUAÇÃO POR ITEM																	
		Vaz et al (2020)	Güçlü et al (2020)	Chen et al (2020)	Azzi et al (2020)	Herrera et al (2021)	Zhong et al (2020)	Caulley et al (2021)	Tutuncu et al (2021)	Wylie et al (2020)	Griesemer et al (2021)	Seneviratne et al (2020)	Yamazaki et al (2021)	Sakanashi et al (2021)	McCormick et al (2020)	Williams et al (2020)	Contreras et al (2020)	Cassinari et al (2021)	
Título e resumo		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
INTRODUÇÃO																			
Contexto/Justificativa		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Objetivos		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
MÉTODOS																			
Desenho do estudo		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Contexto		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Participantes		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Variáveis		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Fontes de dados/ Mensuração		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Vies		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Tamanho do estudo		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Variáveis quantitativas		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Métodos estatísticos		*	*	X	*	*	*	X	*	*	*	*	X	X	X	X	*	*	X
RESULTADOS																			
Participantes		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Dados descritivos		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	X	X	*	*	*	*	X
Desfecho		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Resultados principais		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Outras análises		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	X
DISCUSSÃO																			
Resultados principais		*	*	X	X	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Limitações		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Interpretação		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Generalização		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
OUTRAS INFORMAÇÕES																			
Financiamento		X	X	*	X	*	*	*	*	*	*	*	X	*	*	X	*	*	*
TOTAL		21	21	20	20	22	22	20	22	22	22	22	19	18	20	18	22	19	

Tabela 1 - Avaliação da qualidade metodológica de artigos utilizando a escala STROBE (Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology), onde * corresponde a item atendido pelo artigo e X, parcialmente atendido pelo artigo ou a conformidade com o item não foi clara.

Entre os 17 manuscritos selecionados, 2 estudos prospectivos avaliaram a presença de SARS-CoV-2 no parênquima de glândulas salivares e todos os estudos catalogados avaliaram a presença de SARS-CoV-2 na saliva. O tamanho da amostra variou de acordo com o tipo de cada estudo, e o total de participantes foi de 3677. As características dos estudos selecionados estão descritas a tabela 2.

Título	Periódico Autores	Objetivo	População Metodologia	Resultados	Conclusão
Saliva is a reliable non-invasive specimen for SARS-COV-2 detection	Braz J Infect Dis Vaz et al. (2020)	Validar a utilização da saliva como amostra biológica para o diagnóstico de COVID-19.	(n=155) Participantes que apresentaram sinais/sintomas sugestivos de infecção por SARS-CoV-2 foram submetidos à coleta com swab nasofaríngeo (NPS) e /ou swab orofaríngeo (OPS) e coleta de saliva. Amostras de saliva foram submetidas a RT- Real Time PCR para SARS- Cov-2.	A sensibilidade do RT-PCR com amostras de saliva foi de 94,4% (IC 95% 86,4 – 97,8) e 97,62% (IC 95% 91,7-99,3), respectivamente. Houve alta concordância geral (96,1%) entre os dois testes.	Amostras de saliva coletadas pela própria pessoa é uma alternativa fácil, conveniente e de baixo custo aos testes moleculares baseados em swab nasofaríngeo. Esses resultados podem permitir um uso mais amplo de testes moleculares para o manejo da pandemia de COVID-19, especialmente em locais com recursos limitados.
Comparision of saliva and oronasopharyngeal swab sample in the molecular diagnosis of COVID- 19	Rev Assoc Med Bras Güçlü et al. (2020)	Comparar os métodos de coleta de saliva e swab de naso e orofaringe (ONS)	(n=64) Pacientes foram divididos nos grupos 1, 2 e 3: G1 - pacientes com diagnóstico de COVID-19 confirmado pela reação em cadeia da polimerase (PCR); G2 - achados compatíveis com COVID-19 tomografia computadorizada (TC)	O SARS- Cov-2 foi detectado em 27 (42,2%) amostras de saliva dos pacientes. Enquanto a sensibilidade e o valor preditivo positivo das amostras de saliva foi de 85,2%, a especificidade e o valor preditivo negativo foi	As amostras de saliva podem ser usadas em vez de amostras de região de nasofaringe na detecção de SARS-CoV-2. Investigar o SARS- CoV-2 com saliva é mais barato, mais fácil para o paciente em geral, é mais importante, pois apresenta menor risco de contaminação do

de pulmão, mas com PCR negativo; G3 - pacientes que se apresentaram à emergência com queixas compatíveis, mas com TC normal. Amostras de saliva e de nasofaringe foram coletadas no 3º dia de sintomas nos G1 e G2, enquanto no G3, foram coletadas na admissão hospitalar.

89,2%. O valor de Kappa apresentou concordância substancial (0.744), sendo estaticamente significativo (<0.001).

SARS- CoV-2 para os profissionais de saúde.

Detection of SARS- CoV-2 in saliva and characterization of oral symptoms in COVID-19 patients	Cell Proliferation Chen et al. (2020)	Realizar uma análise de perfis de RNA-seq de bancos de dados públicos e também uma pesquisa por questionário sobre sintomas orais em pacientes com COVID -19.	(n=31) A saliva e material orofaríngeo foram coletados. Os ácidos nucléicos de SARS- CoV-2 na saliva foram detectados por reação em RT-PCR. Além disso, questionário sobre vários sintomas orais, xerostomia e ambligeusia, também foi respondido pelos pacientes.	Dos 4 casos com detecção positiva de ácidos nucléicos de SARS-CoV-2 na saliva, três (75%) estavam gravemente enfermos com suporte ventilatório. Além disso, relatou-se que os dois principais sintomas orais, xerostomia (46,3%) e	Este estudo confirmou a expressão de ACE2 nas glândulas salivares e demonstrou a possibilidade de infecção por SARS-CoV-2 nas glândulas salivares.
---	--	---	---	--	--

ambligeusia (47,2%), foram manifestados por uma proporção relativamente alta de 108 pacientes com COVID-19 que responderam o questionário.

Saliva is a reliable tool to detect SARS- CoV-2	J Infect Azzi et al. (2020)	Analisar amostras salivares de pacientes com COVID- 19 e comparar os resultados com seus dados clínicos e laboratoriais.	(n=25) Amostras salivares de 25 pacientes com COVID-19 foram analisadas por RT-PCR. Foram documentados dados como idade, sexo, comorbidades e uso de drogas. Os valores da lactato desidrogenase (LDH) e da proteína C reativa ultrasensível (usRCP) foram registrados no mesmo dia em que a saliva foi coletada com swab. Foram consideradas a	Todas as amostras apresentaram resultados positivos para a presença de SARS-CoV-2. Dois pacientes apresentaram resultados positivos na saliva nos mesmos dias em que seus swabs faríngeos ou respiratórios mostraram conversão.	A saliva é uma ferramenta confiável para detectar SARS-CoV-2. O papel da saliva no diagnóstico da COVID-19 não se limita a uma detecção qualitativa de vírus, mas também pode fornecer informações sobre a evolução clínica da doença.
---	-----------------------------------	--	--	---	--

			prevalência de positividade na saliva e a associação entre os dados clínicos e o limiar do ciclo como indicador semiquantitativo da carga viral.		
Saliva is a reliable and accessible source for the detection of SARS- CoV-2	Int J Infect Dis Herrera et al. (2021)	Comparar a reprodutibilidade, precisão e viabilidade da amostragem de saliva seguida por RT-qPCR para identificar SARS- CoV-2 e avaliar o uso de saliva em estratégias de agrupamento de amostras.	(n=210) As amostras foram pareadas e coletadas de indivíduos assintomáticos da área de saúde e de trabalhadores de escritório na cidade do México. O processamento da amostra e a análise do material genético do vírus foram realizados.	A concordância entre os resultados de material coletado em nasofaringe (NPS) e a saliva foi de 95,2% (kappa 0,727, p=0,0001) e 97,9 %, respectivamente (p= 0,0001). A saliva teve um número menor de resultados inconclusivos do que o NPS (0,9% vs 1,9%). Além disso, mostrou concentração maior de RNA total e de cópias virais do que o NPS. A comparação dos resultados com os outros dois	A saliva é tão eficaz quanto o material coletado em nasofaringe para a identificação de pacientes assintomáticos infectados com SARS- CoV-2.

				laboratórios mostraram 100% e 97% de concordância.	
Continuously high detection sensitivity of saliva, viral shedding in Salivary glands and high viral load in patients with COVID-19	The Lancet Zhong et al. (2020)	Esclarecer a sensibilidade dos testes em detectar o SARS-CoV-2 na saliva, a eliminação viral nas glândulas salivares, a carga viral durante a infecção e a alteração dos exames laboratoriais após o início dos sintomas.	(n= 49) Os bancos de dados GTEx e TCGA foram usados para análise de expressão de ACE2. Foram obtidos esfregaços faríngeos, orais, e retais; amostras de sangue e saliva para comparação da detecção de vírus. A carga viral foi determinada por RT-qPCR.	Um total de 538 amostras foram obtidas. A taxa de detecção de SARS-CoV-2 por casos positivos em saliva, esfregaços orais, faríngeos, retais e sangue foi de 90,2% (37/41), 49,0% (24/49), 83,7% (41/49), 63,6% (14/22) e 17,4% (4/23), respectivamente. A taxa de detecção por tempos positivos foi de 83,3% (70/84), 40,5% (30/74) 53,7% (130/242), 52,7% (49/93) e 8,9% (4/45), respectivamente. A saliva teve a taxa de detecção mais alta após	A saliva representa uma amostra melhor para detecção de SARS-CoV-2, pois o exame apresentou alta sensibilidade e houve economia de tempo. A alta expressão de ACE2, a alta taxa de detecção de RNA de SARS- CoV-2 na saliva e eliminação contínua de vírus nas glândulas salivares sugerem infecção por SARS-CoV-2 nas glândulas salivares.

<p>Efficacy of commercial mouth-rinses on SARS-CoV-2 viral load in saliva: randomized control trial in Singapore</p>	<p>Infection Seneviratne et al. (2020)</p>	<p>Avaliar a eficácia de três bochechos comerciais com iodo povidona (PI) e gluconato de clorexidina (CPC) na redução da carga viral SARS-CoV-2 salivar em pacientes com COVID-19 em comparação com a água.</p>	<p>(n=36) Um total de 36 pacientes com SARS-CoV-2 foi recrutado, dos quais 16 pacientes foram aleatoriamente designados para 4 grupos-grupo PI (n=4), grupo CHX (n=6), grupo CPC (n=4) e água como grupo controle (n=2). Amostras de saliva foram coletadas dos pacientes no início do estudo e 5min, 3 e 6h após aplicação de enxaguatórios bucais/ água. Foi realizado RT-PCR para detecção de SARS-CoV-2.</p>	<p>início da infecção. Não foram relatadas diferenças significativas na comparação dos grupos.</p>	<p>Observou-se que o efeito da redução da carga salivar com enxágue bucal com Clorexidina e iodo povidona se manteve após 6 horas. Os autores sugerem que o uso de tais colutórios sob a forma de bochechos comerciais pode ser útil como pré-procedimento para ajudar a reduzir a transmissão do COVID-19.</p>
<p>Saliva samples for detection of SARS-CoV-2 in mildly</p>	<p>J Med Virol Tutuncu, Ozgur e</p>	<p>Avaliar o diagnóstico de amostras de saliva em pacientes com</p>	<p>(n=53) Amostras de saliva dos pacientes foram analisadas por RT-PCR.</p>	<p>Entre os 53 pacientes com SARS-CoV-2 detectado na amostra de</p>	<p>As amostras de saliva podem ser consideradas uma alternativa confiável e menos invasiva</p>

symptomatic and asymptomatic patients	Karamese (2021)	sintomas moderados e assintomáticos, com Covid-19 confirmado.		nasofaringe, o RT-PCR em tempo real foi positivo nas amostras de saliva em 48 (90,56%) pacientes.	para o rastreamento de infecções assintomáticas por SARS-CoV-2.
Saliva is more sensitive for SARS-CoV-2 detection in COVID-19 patients than nasopharyngeal swabs	New England Med Wyllie et al. (2020).	Avaliar a detecção de SARS-CoV-2 em esfregaços nasofaríngeos pareados e amostras de saliva coletadas de pacientes internados com COVID-19 e profissionais de saúde assintomáticos com risco moderado a alto de exposição a COVID-19.	(n=44) Para validar o uso de saliva para detecção de SARS-CoV-2, foram testadas amostras de nasofaringe e saliva de pacientes confirmados com COVID-19 e amostras auto-coletadas de profissionais de saúde em enfermarias de COVID-19.	A sensibilidade da detecção do SARS-CoV-2 na saliva é comparável, senão superior aos esfregaços nasofaríngeos no início da hospitalização e é mais consistente durante a hospitalização prolongada e a recuperação.	Os resultados indicam que o uso da saliva para detecção de SARS-CoV-2 é mais sensível e consistente do que o uso de swabs nasofaríngeos. No geral, foi demonstrado que a saliva deve ser considerada como um tipo de amostra confiável para aliviar as demandas dos testes COVID-19.
Evaluation of Specimen Types and Saliva Stabilization Solutions for SARS-CoV-2 Testing	J Clin Microb Griesemer et al. (2021).	Investigar tipos de espécimes alternativos e saliva que fornecem sensibilidade de detecção semelhante	(n=463) A sensibilidade de detecção do SARS-CoV-2 em esfregaços nasais (NS) e de saliva foi comparada com as de nasofaringe	A primeira coorte apresentou apenas 5,4% de positividade para o SARS-CoV-2, mas a segunda coorte (n=227) teve taxa de	A combinação de SN e saliva viabilizou semelhante ao NPS. Os autores encorajam o uso desse tipo de amostra mista e sugerem que seja

		com menor exposição dos profissionais de saúde e potencial para auto-coleta.	(NPS) utilizando amostras correspondentes de dois ambulatórios do estado de New York.	positividade de 41% com sensibilidade da ordem de 97,9% para NPS, 87,1% para NS e 87,1% para saliva. Amostras de NS e saliva simultaneamente resultou em 94,6% de sensibilidade para detecção de SARS- CoV-2.	testada em uma variedade de plataformas e através de diferentes protocolos de atendimento.
Development of a point-of-care test to detect SARS-CoV-2 from saliva which combines a simple RNA extraction method with colorimetric reverse transcription loop-mediated isothermal amplification detection	J Clin Virol Yamazaki, Matsumura, Thongchank aew-Seo, Yamazaki e Nagao (2021).	Avaliar preliminarmente o desempenho do teste em 44 amostras clínicas de saliva utilizando uma abordagem triplex RT-LAMP que faz leitura colorimétrica de um bloco de calor, com resultados avaliados a olho nu.	(n=44) Pacientes com suspeita de infecção de COVID-19 realizaram o teste proposto, o qual durou 45 minutos. Para detectar o COVID-19 em campo, um teste point-of-care (POCT) foi usado na saliva.	Foi detectada sensibilidade diagnóstica de 82,6% (19/23) e especificidade de 100% (21/21), em comparação com o padrão de referência.	A abordagem POCT recentemente desenvolvida propiciou extração simples de RNA a partir da saliva. Os autores sugerem que este tipo de exame pode ser usado em estações de inserção simples em um ambiente de campo, ajudando a reduzir o risco de infecção ao simplificar e acelerar os testes para COVID-19.

<p>Comparative evaluation of nasopharygeal swab and saliva specimens for the molecular detection of SARS-CoV-2 RNA in Japanese patients with COVID-19</p>	<p>Journal of Infection and Chemotherapy Sakanash et al. (2021).</p>	<p>Investigar o uso da saliva como amostra obtida de forma não invasiva para a detecção molecular de RNA do SARS-CoV-2 em pacientes japoneses com COVID-19.</p>	<p>(n=12) No total, 28 amostras clínicas pareadas de saliva e esfregaço nasofaríngeo foram coletados de 12 pacientes em vários momentos após o início dos sintomas. Cada amostra foi testada usando RT-PCR.</p>	<p>As amostras de saliva e esfregaço nasofaríngeos apresentaram 19 e 15 resultados positivos, respectivamente. Os resultados qualitativos de cada espécime obtido no período imediatamente após o início dos sintomas foram semelhantes. Três pacientes convalescentes apresentaram resultados positivos para a saliva enquanto seus swabs nasofaríngeos foram negativos em 4 momentos diferentes, sugerindo que a saliva pode ser superior aos swabs nasofaríngeos em termos de obtenção de resultado de</p>	<p>Os resultados sugerem que a saliva pode servir potencialmente como uma alternativa aos esfregaços nasofaríngeos como uma amostra para a realização de RT-PCR para SARS-CoV-2.</p>
---	--	---	---	---	--

				ensaio estável de SARS- CoV-2.	
Saliva as an Alternate Speciment Source of Detection of SARS- CoV-2 In Symptomatic Patients Using Cepheid Xpert SARS- CoV-2.	J Clin Microbiol McComick-Baw et al. (2020).	Validar amostras de saliva para o diagnóstico de COVID-19 usando o teste de PCR Cepheid Xpert Xpress SARS- CoV-2 (Sunnyvale, CA).	(n=156) As amostras de saliva foram comparadas às amostras da região de nasofaringe (NPS). As amostras de saliva foram provenientes do departamento de emergência e de pacientes hospitalizados com COVID-19. As amostras de NPS foram coletas de maneira padrão e, da mesma forma, os testes foram realizados de acordo com as instruções do fabricante.	A positividade geral foi de 50/156 (32,1%). A taxa de positividade da comunidade durante a semana de 11,1%. Um total de 153/156 (98%; intervalo de confiança de 95% [IC]. 94,48% a 99,60%) amostras estavam em concordância geral. Além disso, 47/49 amostras foram positivas na saliva em comparação com o NPS, resultando em uma concordância percentual positiva de 96% (IC de 95% 86,02% a 99,5%). Um total de 105/106 amostras teve	A saliva é uma alternativa aceitável para a detecção de ácidos nucleicos do SARS- CoV-2. Outra vantagem da saliva em relação ao NPS é que o processo de coleta de saliva não é invasivo, e um paciente, com educação e treinamento, pode coletar as amostras por conta própria.

um resultado negativo de saliva e NPS. Uma única amostra demonstrou níveis detectáveis de ácido nucleico SARS- CoV-2 na saliva, mas o NPS foi negativo (1/106), resultando em uma concordância percentual negativa de 99% (IC95%, 94,86% a 99,98%).

Saliva as a Noninvasive Specimen for Detection of SARS- CoV-2	J Clin Microbiol Williams, Bond, Zhang, Putland e Williamson (2020).	Investigar a viabilidade e a utilidade da coleta de saliva de pacientes ambulatoriais que se apresentaram a uma clínica de triagem de COVID-19 em Melbourne, Austrália.	(n =39) 622 pacientes foram testados para COVID-19. Todos tinham esfregaços de nasofaringe (NPS), e 522/622 (83,9%) também forneceram saliva.	No geral, 39/622 (6,3%; intervalo de confiança de 95% [IC], 4,6% a 8,5%) pacientes exibiram RT-PCR positivo com NPS e 33/39 pacientes (84,6%; IC de 95%, 70,0 a 93,1) apresentaram SARS- CoV-2 detectado na saliva.	Foram demonstradas a viabilidade, aceitabilidade e escalabilidade da coleta prospectiva de saliva de pacientes ambulatoriais. Os autores sugerem que a saliva representa uma mostra não invasiva para a detecção de SARS- CoV-2.
---	--	---	---	---	--

Saliva Sampling and its Direct Lysis, an Excellent Option To increase the Number of SARS- CoV-2 Diagnostic Tests in Settings with Supply Shortages.	J Clin Microbiol Moreno-Contreras et al. (2020)	Evidenciar que as amostras de saliva lisadas diretamente podem servir como uma fonte adequada para a detecção de RNA viral, que são menos dispendiosas e podem ser tão eficientes quanto o protocolo clássico	(n=253) Amostras pareadas de esfregaços orofaríngeos e nasofaríngeos (OPSs e NPSs, respectivamente) e saliva foram coletados durante um período de 30 dias por profissionais de saúde.	Dos 182 pacientes com um único esfregaço coletado, 80 (43,9%) foram positivos para SARS-CoV-2. Destes, 41 (51,2%) apresentaram PCR positivo para os dois tipos de amostras, enquanto 28 (35%) foram positivos apenas com saliva e não com o esfregaço nasofaríngeo; e 11 (13,7%) foram positivos apenas com o OPS. No total, dos 80 indivíduos considerados positivos para o vírus, 69 (86,2%) foram identificadas corretamente pela saliva, enquanto apenas 52 (65%) foram identificados pelo OPS.	Os resultados indicam que um processamento rápido de saliva usando lise direta com tampão parece ser uma excelente alternativa para a análise de RNA do SARS-CoV-2. Trata-se de um método sensível, rápido e barato que pode ser usado para triagem massiva e particularmente, naqueles ambientes onde os suprimentos comuns necessários para os métodos clássicos estão em falta.
---	--	---	---	---	--

Assessment of Multiplex Digital Droplet RT-PCR as a Diagnostic Tool for SARS-CoV-2 Detection in Nasopharygeal Swabs and Saliva Samples	Clin Chem Cassinari et al. (2021).	Desenvolver e validar um teste para COVID-19 do tipo multiplex RT-ddPCR com 6 conjuntos de primers de sonda já validados em ensaios qPCR, e então avaliar o desempenho do ensaio para a detecção de SARS-CoV-2 em nasofaringe e amostras de saliva coletadas em uma coorte de pacientes.	(n=130) Foi desenvolvido um ensaio multiplex de transcrição reversa digital de gotículas PCR (RT-ddPCR), visando 6 regiões genômicas do SARS-CoV-2, e material coletado em nasofaringe e amostras de saliva coletadas de 130 indivíduos com COVID-19, sendo esses pacientes ambulatoriais positivos ou negativos, que apresentaram sintomas sugestivos de infecção por SARS-CoV-2 leve ou moderada.	Para as amostras de esfregaço de nasofaringe os resultados obtidos com os ensaios 6-plex RT-ddPCR e RT-qPCR foram todos concordantes. O ensaio 6-plex RT-ddPCR foi mais sensível do que RT-qPCR (85% versus 62%) em amostras de saliva de pacientes com esfregaços da região de nasofaringe.	Multiplex RT-ddPCR demonstrou ser uma ferramenta alternativa e complementar para o diagnóstico de COVID-19, em particular para controlar resultados ambíguos de RT-qPCR. Também pode ser aplicado à saliva para amostragem e teste repetitivos de indivíduos para os quais o esfregaço nasofaríngeo não é possível.
--	---------------------------------------	--	--	--	---

Tabela 2: Síntese dos manuscritos selecionados. Período de busca: novembro de 2020 até maio de 2021. Salvador. Bahia. Brasil.

4. Discussão

O presente estudo objetivou compilar evidências científicas atuais acerca da presença de SARS-CoV-2 em glândulas salivares e na saliva e discutir a relevância deste conhecimento na prática clínica odontológica. Esse tema assume grande relevância tendo em vista as crescentes “ondas” de infecções provocadas pelo vírus e suas variantes em todo o mundo e por permitir avaliar o potencial da saliva como meio de transmissão da doença e o desenvolvimento de testes diagnósticos menos invasivos. Recentemente, McCormick-Baw et al. (2020), demonstraram que o teste PCR Cepheid Xpert Xpress SARS-CoV-2 (Sunnyvale, CA) foi eficaz em detectar ácidos nucleicos do SARS-CoV-2 na saliva. Este resultado demonstra que a coleta da saliva para o diagnóstico de COVID-19 pode ser considerado um método opcional, não invasivo, rápido e eficaz, principalmente em locais em que há escassez de insumos para testes que são realizados com material coletado a partir da nasofaringe e que necessitam de alternativas para realização de exames diagnósticos.

Na presente revisão sistemática observou-se que Zhong et al. (2020) evidenciaram, em estudo com 49 pacientes adultos diagnosticados com COVID-19, uma significativa taxa de expressão do receptor ACE2 nas glândulas salivares, assim como uma contínua eliminação de SARS-CoV-2 e detecção de RNA de SARS-CoV-2 na saliva. Além disso, constataram que a taxa de detecção na saliva de 90,2% foi mais alta e mais sensível do que no esfregaço faríngeo (83,7%), mucosa oral (49,0%), mucosa retal (63,6%) e amostras de sangue que se situaram em torno de 17,4%. Estes dados se repetiram nas análises seriadas e também naquelas realizadas em um único momento de coleta. Foi constatado, através do presente levantamento da literatura, um único estudo que avaliou a presença do SARS-Cov-2 em saliva coletada diretamente do ducto de Wharton a fim de conseguir fluido estéril do canal das glândulas. Esta análise foi realizada por Chen et al. (2020), os quais demonstraram em seu estudo diagnóstico com 31 pacientes, que 13 deles tiveram resultado positivo para COVID-19 e 4 indivíduos apresentaram positividade nas amostras de saliva, os quais representaram 75% dos casos graves que necessitaram de intubação.

Vaz et al. (2020), em um estudo epidemiológico com 155 participantes, constataram que 96,1% apresentaram RT-PCR positivo para SARS-CoV-2 tanto na saliva quanto nos esfregaços faríngeo e nasofaríngeo, sendo que o maior percentual de testes positivos foi constatado em material colhido da região faríngea e nasofaríngea. Além disso, ao utilizar como padrão-ouro o RT-PCR de amostras faríngeas e nasofaríngeas para avaliar a especificidade e sensibilidade deste teste nas amostras de saliva, observou-se percentuais elevados da ordem de 97,62% e 94,4%, respectivamente.

Azzi et al. (2020), avaliaram 25 pacientes e observaram que 2 destes apresentaram resultado positivo nas amostras de saliva no mesmo dia em que o material coletado dos esfregaços faríngeos ou broncoalveolares apresentaram resultados negativos. No estudo de acurácia diagnóstica de Tutuncu et al. (2021), que também utilizou o RT-PCR para o diagnóstico de SARS-CoV-2 em amostras nasofaríngeas, com 53 pacientes, 90,56% demonstraram positividade no RT-PCR para SARS-CoV-2 nas amostras de saliva. Tais estudos parecem indicar que a saliva pode ser um material biológico útil adicional para análise da presença do SARS-Cov-2, tanto em situação de infecção ativa, quanto em indivíduos assintomáticos.

Há crescente evidência na literatura que tem ratificado a presença do SARS-Cov-2 na saliva e nas glândulas salivares. Güçlü et al. (2020), em estudo prospectivo que acompanhou 64 participantes, documentaram detecção de

SARS-CoV-2 na saliva em 42,2% da amostra. Cerca de 36% dos participantes apresentaram teste positivo tanto para o esfregaço oronasofaríngeo quanto para a amostra de saliva. Tal investigação também foi realizada por Wyllie et al. (2021). Estes autores realizaram um estudo prospectivo de coorte com 44 pacientes testados positivos para SARS-CoV-2 usando esfregaços nasofaríngeo e/ou orofaríngeo e saliva. Foi demonstrado também que os títulos de SARS-CoV-2 na saliva foram significativamente maiores do que na amostra nasofaríngea ao se analisar cada paciente individualmente. Além disso, em 21% das amostras foi detectado SARS-CoV-2 na saliva, mas não nos esfregaços nasofaríngeos. Resultados semelhantes foram descritos por Griesemer et al. (2021).

Adicionalmente, alguns outros estudos também têm procurado avaliar de forma comparativa a acurácia de testes diagnósticos em material biológico oriundo de esfregaços orofaríngeos e aquele representado pela saliva. Neste contexto, Moreno-Contreras et al. (2020), realizaram em estudo prospectivo de acurácia diagnóstica com 253 pacientes ambulatoriais com suspeita de infecção por COVID-19. Nesse sentido, um grupo de 182 pacientes foi submetido a um único esfregaço orofaríngeo e 80 testaram positivo para SARS-CoV-2. O teste com material orofaríngeo e nasofaríngeo, (82,3%) demonstrou maior eficácia na detecção do vírus em relação ao material biológico salivar (73,5%), com uma taxa de coincidência de 55,8%. Resultados divergentes foram descritos por Herrera et al. (2021), através de estudo de coorte transversal com 2107 profissionais de saúde, no qual 98% dos testes mostraram resultados semelhantes com a saliva e o esfregaço nasofaríngeo. Além disso, a saliva apresentou menor percentual de resultados inconclusivos do que aqueles resultantes dos esfregaços nasofaríngeos. Percebe-se que ainda não existe um consenso na literatura sobre a acurácia dos diferentes tipos de testes existentes quando estes são realizados utilizando-se saliva.

Em virtude da alta variação das cargas virais encontradas em testes de RT-qPCR, a busca por novas formas de diagnóstico para Sars-Cov-2 foi desenvolvida, principalmente para diferentes regiões do genoma viral. Cassinari et al. (2021), em análise prospectiva de esfregaços nasofaríngeos e amostras de saliva usando o ensaio 6-Plex RT-ddPCR (Bio-Rad Laboratories) para 130 pacientes, demonstraram que a sensibilidade dos ensaios moleculares para COVID-19 realizados em material biológico salivar foi significativamente menor em comparação aos esfregaços nasofaríngeos, pois a carga viral média foi 400 vezes menor na saliva. Além disso, foi demonstrado maior sensibilidade do ensaio multiplex RT-ddPCR (85% (Bio-Rad Laboratories) em comparação com o RT-qPCR (62%) para análises de saliva. Yamazaki et al. (2021), em estudo diagnóstico com 44 amostras de saliva provenientes de pacientes com suspeita de infecção por COVID-19 utilizaram o teste triplex RT-LAMP realizado através de uma leitura colorimétrica a partir de um bloco de calor, com resultados avaliados a olho nu. Das amostras utilizadas, 23 tiveram resultados positivos e 21 tiveram resultados negativos pelo método de referência. A sensibilidade diagnóstica foi 82,6% e a especificidade de 100%. A partir destes achados, pode-se sugerir que até o presente estágio da pandemia, o RT-PCR que processa material coletado da região nasofaríngea ainda continua sendo o teste mais usado para o diagnóstico da COVID-19 devido à sua acurácia e alta sensibilidade.

Contudo, devido à escassez de insumos para realização de esfregaços orofaríngeos e nasofaríngeos em diversos países, além da redução do desconforto dos pacientes, urge a necessidade de alternativas para diagnóstico de infecção pelo SARS-CoV-2. Williams et al. (2020), em estudo diagnóstico, analisaram a viabilidade e a utilidade da coleta de saliva de 622 pacientes que foram testados positivos para COVID-19. O diagnóstico por meio das amostras salivares representou 84,6% dos resultados do PCR em esfregaços nasofaríngeos já positivados. Para avaliar a

especificidade, também foi testado um subconjunto de amostras salivares de 50 pacientes com esfregaços nasofaríngeos PCR-negativos, o SARS-CoV-2 foi detectado em 2% dessas amostras de saliva. Resultados semelhantes foram observados no estudo de McCormick-Baw et al. (2020), que buscaram validar amostras de saliva para o diagnóstico de COVID-19 utilizando o teste PCR Cepheid Xpert Xpress (Sunnyvale, CA) com saliva não conservada coletada no pronto-socorro. É relevante notar que, nesse estudo, houve percentual próximo para os resultados positivos (96%) e negativos (99%) dos esfregaços nasofaríngeos e do material biológico salivar. Evidências similares também foram encontradas por Sakanash et al. (2020).

A pandemia do SARS-CoV-2 revolucionou as práticas em diversas áreas da saúde e na Odontologia este efeito não foi diferente. Os cirurgiões-dentistas representam um grupo de profissionais de saúde que apresentam grande risco de contrair a COVID-19 assim como infecção cruzada pois lidam diretamente com aerossóis provenientes do fluxo salivar e secreção do trato respiratório. O uso de máscaras eficazes, álcool a 70% e equipamentos para proteção individual (EPIs) tornaram-se fundamentais para diminuir a transmissão do SARS-CoV-2. Diversas autoridades internacionais sugeriram o uso de enxaguantes bucais como uma medida de controle de infecção pré-processual. Seneviratne et al. (2020), em estudo controle randomizado avaliaram a eficácia de três enxaguantes bucais: povidone-iodine (PI), cloroxidina gluconato (CHX) e cloreto de cetilrílio (CPC) em comparação com a água, na redução da carga viral salivar em pacientes com COVID-19. Foram selecionados 36 pacientes SARS-CoV-2 positivos, dos quais 16 pacientes foram atribuídos de forma aleatória a quatro grupos. Os grupos submetidos ao uso de PI e CHX apresentaram diminuição da carga salivar após o uso desses colutórios bucais. Os autores sugeriram que o enxágue pré-processual pode ser útil para reduzir a transmissão da COVID-19.

Especificamente, para pacientes críticos, a saliva tem um potencial maior para detecção de SARS-CoV-2. Embora a detecção positiva de ácidos nucleicos em swab orofaríngeo seja um dos critérios diagnósticos para testes de COVID-19, profissionais de saúde estão expostos a risco de infecção durante a coleta de amostras. Além disso, a coleta de amostras de orofaringe pode causar desconforto aos pacientes, como dor, náusea e até mesmo sangramento. Portanto, o estudo da saliva pode ser uma nova fonte de diagnóstico, especialmente para pacientes críticos, uma vez que pode ser facilmente coletado sem quaisquer procedimentos invasivos, o que é vantajoso tanto para profissionais de saúde e pacientes, especialmente para amostragem múltipla e monitoramento das cargas virais (Chen et al., 2020).

Como a amostragem de saliva é um procedimento de coleta não invasivo, ela representa, como demonstrado por um número crescente de estudos, uma estratégia apropriada para testar indivíduos repetidamente (por exemplo, em asilos), para testar indivíduos para os quais os swabs nasofaríngeos são contraindicados, ou para testar grandes populações suspeitas de apresentarem alta carga viral (Cassinari et al., 2021). Além disso, a saliva pode ser auto recolhida pelo paciente com o mínimo de orientação e intervenção do pessoal de saúde (Azzi et al., 2020).

O teste de saliva pode ser um teste de triagem de primeira linha alternativo adequado em vários ambientes, incluindo configurações de baixo recurso, com teste nasofaríngeo reservado para pacientes com um alto índice clínico contínuo de suspeita. Essas descobertas são altamente relevantes em face da escassez de swabs e equipamentos de proteção em muitos ambientes (Williams et al., 2020). A detecção do vírus em saliva também tem sido usada para monitorar a dinâmica da carga viral ao longo do tempo, indicando que a maior carga viral na saliva se apresenta durante a primeira semana após o início dos sintomas e depois diminui ao longo do tempo (Herrera et al., 2021).

A amostragem de saliva também pode ser considerada como amostra suplementar em pacientes com testes negativos em swabs nasofaríngeos, mas com sintomas fortemente sugestivos de COVID-19. Os resultados falsos negativos de RT-qPCR podem estar relacionados a uma menor celularidade dos swabs nasofaríngeos para amostragem. Esta ideia é apoiada pela observação de que, em algumas amostras, o RT-ddPCR detectou uma concentração viral maior na saliva do que no swab nasofaríngeo (Cassinari et al., 2021). Os resultados falsos negativos na saliva podem ser devidos à ausência ou níveis indetectáveis de vírus nas amostras, ou a problemas durante a coleta, transporte e/ou armazenamento antes de sua chegada ao laboratório. Griesemer et al. (2021), encontraram surpreendente estabilidade do RNA viral na saliva por até 7 dias, mesmo em temperatura ambiente, enquanto a adição de soluções de estabilização teve efeitos adversos. A estratégia de amostragem de saliva tem limitações: pode não ser adequada para crianças, pacientes com deficiência mental ou pacientes graves. A coleta de saliva claramente não é adequada para pacientes intubados, e o uso de tipos alternativos de amostras deve ser continuado para essas situações.

Desde o início da pandemia, tem havido uma preocupação crescente com o risco da transmissão do SARS-CoV-2 na prática odontológica. Profissionais de saúde bucal estão expostos a aerossóis da cavidade oral dos pacientes, o que pode ser um risco potencial para equipe e talvez outros pacientes (Seneviratne et al., 2020). Assim, além de medidas de proteção rigorosas, reduzir os títulos virais salivares em pacientes com COVID-19, através do uso de enxaguantes bucais, por exemplo, pode ser uma das principais abordagens para evitar a transmissão de COVID-19, particularmente em ambientes odontológicos.

5. Conclusão

Estudos de acurácia diagnóstica e prospectivos, estudos de corte transversal, coorte, ensaios clínicos randomizados e não randomizados, incluídos na presente revisão sistemática, revelaram evidências científicas atuais acerca da presença de SARS-CoV-2 em glândulas salivares e na saliva. Este conhecimento assume grande relevância para a prática clínica odontológica. Foi constatada a eficácia do RT-PCR com material salivar para detecção do SARS-CoV-2, semelhante aos testes baseados em esfregaços orofaríngeos e nasofaríngeos, principalmente no diagnóstico de pacientes assintomáticos, embora essa discussão ainda seja incipiente na comunidade científica internacional. A detecção de SARS-CoV-2 na saliva demonstrou ser uma alternativa segura e de fácil exequibilidade para obtenção de dados qualitativos em relação ao vírus e informações sobre o curso clínico da doença, todavia, mais estudos precisam ser realizados, com o objetivo futuro de implementação desta técnica facilitadora para obtenção do diagnóstico de COVID-19, de forma segura e eficaz.

Referências

Azzi, L., Carcano, G., Gianfagna, F., Grossi, P., Gasperina, D. D., Genoni, A., ... & Baj, A. (2020). Saliva is a reliable tool to detect SARS-CoV-2. *Journal of Infection*, 81(1), e45-e50. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.04.005>

- Benvenuto, D., Giovanetti, M., Ciccozzi, A., Spoto, S., Angeletti, S., & Ciccozzi, M. (2020). The 2019-new coronavirus epidemic: evidence for virus evolution. *Journal of Medical Virology*, 92(4), 455-459. doi: <https://doi.org/10.1002/jmv.25688>
- Burgueño-Rodríguez, G., Méndez, Y., Olano, N., Dabezies, A., Bertoni, B., Souto, J., ... & Soler, A. M. (2020). Ancestry and TPMT-VNTR Polymorphism: relationship with hematological toxicity in uruguayan patients with Acute lymphoblastic leukemia. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 1-8. doi: <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.594262>
- Cassinari, K., Alessandri-Gradt, E., Chambon, P., Charbonnier, F., Gracias, S., Beaussire, L., ... & Frebourg, T. (2021). Assessment of multiplex digital droplet RT-PCR as a diagnostic tool for SARS-CoV-2 detection in nasopharyngeal swabs and saliva samples. *Clinical Chemistry*, 67(5), 736-741. doi: <https://doi.org/10.1093/clinchem/hvaa323>
- Chen, L., Zhao, J., Peng, J., Li, X., Deng, X., Geng, Z., ... & Wang, S. (2020). Detection of SARS-CoV-2 in saliva and characterization of oral symptoms in COVID-19 patients. *Cell Proliferation*, 53(12), e12923. doi: <https://doi.org/10.1111/cpr.12923>
- Chowdhury, P., Paul, S. K., Kaiser, S., & Moktadir, A. (2021). COVID-19 pandemic related supply chain studies: A systematic review. *Transportation Research Part E: Logistics and Transportation Review*, 148, 102271. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tre.2021.102271>
- Griesemer, S. B., Slyke, G. V., Ehrbar, D., Strle, K., Yildirim, T., Centurioni, D. A., ... & George, K. S. (2021). Evaluation of specimen types and saliva stabilization solutions for SARS-CoV-2 testing. *Journal of Clinical Microbiology*, 59(5), e01418-e01420. doi: <https://doi.org/10.1128/JCM.01418-20>
- Güçlü, E., Koroglu, M., Yürümez, Y., Toptan, H., Kose, E., Güneysu, F., & Karabay, O. (2020). Comparison of saliva and oro-nasopharyngeal swab sample in the molecular diagnosis of COVID-19. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 66(8), 1116-1121. doi: <https://doi.org/10.1590/1806-9282.66.8.1116>
- Herrera, L. A., Hidalgo-Miranda, A., Reynoso-Noverón, N., Meneses-García, A. A., Mendoza-Vargas, A., Reyes-Grajeda, J. P., ... & Escobar-Escamilla, N. (2021). Saliva is a reliable and accessible source for the detection of SARS-CoV-2. *International Journal of Infectious Diseases*, 105, 83-90. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2021.02.009>
- Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Schroeder, S., Krüger, N., Herrler, T., Erichsen, S., ... & Pöhlmann, S. (2020). SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell*, 181(2), 271-280. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.052>
- Huang, C., Wang, Y., Li, X., Ren, L., Zhao, J., Hu, Y., ... & Cao, B. (2020). Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet*, 395(10223), 497-506. doi: [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(20\)30183-5](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(20)30183-5)
- McCormick-Baw, C., Morgan, K., Gaffney, D., Cazares, Y., Jaworski, K., Byrd, A., ... & Cavuoti, D. (2020). Saliva as an alternate specimen source for detection of SARS-CoV-2 in symptomatic patients using Cepheid Xpert Xpress SARS-CoV-2. *Journal of clinical microbiology*, 58(8), e01109-20. doi: <https://doi.org/10.1128/jcm.01109-20>
- Moreno-Contreras, J., Espinoza, M. A., Sandoval-Jaime, C., Cantú-Cuevas, M. A., Barón-Olivares, H., Ortiz-Orozco, O. D., ... & López, S. (2020). Saliva sampling and its direct lysis, an excellent option to increase the number of

- SARS-CoV-2 diagnostic tests in settings with supply shortages. *Journal of Clinical Microbiology*, 58(10), e01659. doi: <https://doi.org/10.1128/jcm.01659-20>
- Sakanashi, D., Asai, N., Nakamura, A., Miyazaki, N., Kawamoto, Y., Ohno, T., ... & Mikamo, H. (2021). Comparative evaluation of nasopharyngeal swab and saliva specimens for the molecular detection of SARS-CoV-2 RNA in Japanese patients with COVID-19. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 27(1), 126-129. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2020.09.027>
- Seneviratne, C. J., Balan, P., Ko, K. K. K., Udawatte, N. S., Lai, D., Ng, D. H. L., ... & Sim, X. Y. J. (2021). Efficacy of commercial mouth-rinses on SARS-CoV-2 viral load in saliva: randomized control trial in Singapore. *Infection*, 49(2), 305-311. doi: <https://doi.org/10.1007/s15010-020-01563-9>
- Song, J. W., Zhang, C., Fan, X., Meng, F. P., Xu, Z., Xia, P., ... & Zhang, J. Y. (2020). Immunological and inflammatory profiles in mild and severe cases of COVID-19. *Nature Communications*, 11(1), 1-10. doi: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17240-2>
- Tutuncu, E. E., Ozgur, D., & Karamese, M. (2021). Saliva samples for detection of SARS-CoV-2 in mildly symptomatic and asymptomatic patients. *Journal of Medical Virology*, 93(5), 2932-2937. doi: <https://doi.org/10.1002/jmv.26821>
- Vaz, S. N., Santana, D. S. de, Netto, E. M., Pedroso, C., Wang, W. K., Santos, F. D. A., & Brites, C. (2020). Saliva is a reliable, non-invasive specimen for SARS-CoV-2 detection. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 24(5), 422-427. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2020.08.001>
- Williams, E., Bond, K., Zhang, B., Putland, M., & Williamson, D. A. (2020). Saliva as a non-invasive specimen for detection of SARS-CoV-2. *Journal of Clinical Microbiology*, 58(8), e00776. doi: <https://doi.org/10.1128/jcm.00776-20>
- Wyllie, A. L., Fournier, J., Casanovas-Massana, A., Campbell, M., Tokuyama, M., Vijayakumar, P., ... & Grubaugh, A. I. (2020). Saliva is more sensitive for SARS-CoV-2 detection in COVID-19 patients than nasopharyngeal swabs. *New England Journal of Medicine*, 1-12. doi: <https://doi.org/10.1101/2020.04.16.20067835>
- Yamazaki, W., Matsumura, Y., Thongchankaew-Seo, U., Yamazaki, Y., & Nagao, M. (2021). Development of a point-of-care test to detect SARS-CoV-2 from saliva which combines a simple RNA extraction method with colorimetric reverse transcription loop-mediated isothermal amplification detection. *Journal of Clinical Virology*, 136, 104760. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2021.104760>
- Zhong, F., Liang, Y. J., Xu, J. B., Chu, M., Tang, G. F., Hu, F. Y., ... & Liao, G. Q. (2020). Continuously high detection sensitivity of saliva, viral shedding in salivary glands and high viral load in patients with COVID-19. *The Lancet*, (20), 1-23. doi: <https://doi.org/10.2139/ssrn.3576869>

ANEXOS

Anexo A – Parecer Consubstanciado do CEP

FACULDADE ADVENTISTA DA BAHIA

Certificamos que a proposta para pesquisa intitulada: “Avaliação termográfica de feridas de ratos sob efeito de terapias biomoduladoras” foi submetido ao CEUA da FADBA para avaliação de protocolos para uso de animais em ensino. Registrada com o protocolo de n.67/2019, sob a responsabilidade de Antônio Márcio Teixeira Marchionni – que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica ou ensino – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n. 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n. 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), apresenta-se na condição de APROVADO.

Parecer emitido em 11/09/2019 pela comissão de ética no uso de animais (CEUA) da FADBA com CIAEP: 01.0039.2013, DOU EM 05/09/2013.

FINALIDADE	() ENSINO (x) PESQUISA CIENTÍFICA
Vigência da autorização	03 /12/2019 - 13/12/2019
Espécie/linhagem/raça	Rato Wistar
N. de animais	50
Peso/Idade	250g / 3 meses
Sexo	Machos
Origem	Subrilab: Suprimento de laboratório e Biotério Ltda.

Coordenação CEUA: Helen Meira Cavalcanti Pola

Anexo B – Comprovante de submissão do artigo intitulado “Avaliação histomorfométrica de feridas cutâneas de ratos submetidas a terapias biomoduladoras – protocolo de pesquisa”, submetido no journal of evidence-based healthcare

16/01/2023 19:58

Email – ALENA PEIXOTO MEDRADO – Outlook

[Evidence] Editor Decision

BAHIANA Journals <notificacoesrevistacientifica@bahiana.edu.br>

Qui, 17/11/2022 14:20

Para: ALENA PEIXOTO MEDRADO <apmedrado@bahiana.edu.br>; FLAVIA QUADROS LIMA <flaviaquadros.pos@bahiana.edu.br>; marchionni@uol.com.br <marchionni@uol.com.br>

 1 anexos (14 KB)

C-Evidence 4105-Consolidated reviews.docx;

Dear authors,

The editorial committee of Journal of **Evidence-Based Healthcare** has ruled that the paper "AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA DE FERIDAS CUTÂNEAS DE RATOS SUBMETIDAS A TERAPIAS BIOMODULADORAS – PROTOCOLO DE PESQUISA " requires mandatory adjustments.

Please, read the review attached to this e-mail and make the requested corrections.

Please, make sure that the text modifications have been marked in red.

You must also send us a response letter explaining which modifications were made and which were not. In the letter, explain the reasons why some of the requested corrections were not made if this was the case.

The deadline is **07/12/22**. We request you to please send the files through the journal's platform.

Thank you for your interest in our community.

Best regards,

Carolina Barreto

Executive Editor

BAHIANA Journals

BAHIANA - School of Medicine and Public Health

<https://journals.bahiana.edu.br>

Please consider the ENVIRONMENT before printing.

Journal of Evidence-based Healthcare <https://www5.bahiana.edu.br/index.php/evidence>

AVISO LEGAL: Mensagem destinada exclusivamente para a(s) pessoa(s) a quem é(são) dirigida(s), podendo conter informação confidencial e legalmente protegida. Se você não for destinatário desta mensagem, fica notificado, desde já, de abster-se de divulgar, copiar, distribuir, examinar ou, de qualquer forma, utilizar as informações aqui contidas, por ser ilegal. Caso tenha recebido esta mensagem por engano, solicitamos, se possível, o envio de resposta relatando o ocorrido.