

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 11/09/2021.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

CAMILA LOPES FERREIRA

**EFEITO DA ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA NO
PROCESSO DE REPARAÇÃO DE TECIDO MOLE
NO PALATO: estudo em camundongos**

2020

CAMILA LOPES FERREIRA

**EFEITO DA ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA NO
PROCESSO DE REPARAÇÃO DE TECIDO MOLE NO
PALATO: estudo em camundongos**

Tese apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL.

Área: Patologia. Linha de pesquisa: Inflamação e reparação tecidual.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Aparecida Neves Jardim

São José dos Campos

2020

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2020]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Ferreira, Camila Lopes

Efeito da estimulação elétrica no processo de reparação de tecido mole no palato: estudo em camundongos / Camila Lopes Ferreira. - São José dos Campos : [s.n.], 2020.
46 f. : il.

Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em Biopatologia Bucal - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2020.

Orientadora: Maria Aparecida Neves Jardim.

1. Estimulação Elétrica. 2. Mucosa bucal. 3. Cicatrização. 4. Reepitelização. 5. Ferida cirúrgica. I. Jardim, Maria Aparecida Neves, orient. II. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. IV. Universidade Estadual Paulista (Unesp). V. Título.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Assoc. Maria Aparecida Neves Jardimi (Orientadora)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Profa. Assist. Daniela Baccelli Silveira Mendonça

University of Michigan

School of Dentistry

Ann Arbor

Prof. Dr. Thiago Antônio Moretti de Andrade

Centro Universitário Fundação Hermínio Ometto

Campus de Araras

Profa. Dra. Andrea Carvalho de Marco

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Profa. Dra. Marianne Spalding

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 11 de março de 2020.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais: Carlos e Ana Lúcia,
por todo o incentivo, pelas palavras de encorajamento, pelo ensinamento de
vida e pelo exemplo.

Aos meus avós,
que tiveram papel essencial para que toda essa jornada fosse possível.

À minha irmã,
que dividiu comigo momentos de alegria e saudades.

À minha tia Marta,
que me faz refletir sobre os diversos caminhos da vida.

E, ao meu amor Waldir,
que chegou quase no fim dessa jornada, mas que fez toda a diferença.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, nosso criador.

Ao plano da espiritualidade que está sempre presente em todos os momentos da minha vida, guiando-me nos caminhos do Amor, da Paz e da Verdade.

À minha orientadora, Prof. Ucha, pelo exemplo de ser humano que é, pela garra que possui em fazer tudo cada vez melhor, pela coragem. Sem dúvida, eu aprendi muito com você, coisas que somente a convivência pode ensinar.

À Prof. Daniela Mendonça e ao Prof. Gustavo Mendonça, por terem aberto as portas de um novo mundo de possibilidades, sem ao menos me conhecerem, por todo o acolhimento, incentivo e apoio durante minha estadia no exterior.

Ao Prof. Mauro Santamaria, pela idealização do projeto, pela participação na banca do exame geral de qualificação e pelos conselhos ao longo da jornada.

Ao Prof. Amorim, pela participação e contribuições dadas no exame geral de qualificação.

Aos colegas e amigos durante esse período de pós-graduação, ao longo da jornada tivemos momentos de alegria e de desespero, a chegada de novas pessoas e a despedida de outras, pude observar as escolhas de cada um, o caminhar em busca de suas próprias realizações e aprender com cada um de vocês.

À Camilla Nunes e à Daniella Bernardo, pela amizade, pelo companheirismo na execução dos trabalhos, pelas conversas no biotério. Sim, tudo isso foi muito bom e inesquecível ☺

À Capes, pela concessão da bolsa de doutorado e pela bolsa do Programa de Doutorado-Sanduíche no Exterior (PDSE), sem estas muito do trabalho aqui realizado, assim como outros em paralelo, seriam bem mais difíceis de serem realizados. *“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001”*

Aos funcionários do ICT-Unesp, aos técnicos de laboratórios/clinicas, aos professores, todos vocês foram essenciais para que tudo isso acontecesse.

"A aprendizagem, às vezes, é dolorosa, porém a recompensa é a própria vida,
rica, fecunda e prazerosa."

Hammed – A Busca do Melhor – médium Francisco do Espírito Santo Neto

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	9
RESUMO	11
ABSTRACT	12
1 INTRODUÇÃO	13
2 PROPOSIÇÃO	16
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1 Amostra	17
3.1.1 Tamanho da amostra	17
3.1.2 Distribuição da amostra.....	18
3.2 Confecção da lesão no palato	18
3.3 Estimulação elétrica	19
3.4 Período experimental	20
3.5 Avaliação fotográfica da lesão.....	21
3.6 Preparo e processamento dos espécimes	21
3.6.1 Análise morfométrica do fechamento da lesão.....	22
3.6.2 Avaliação da densidade de fibras colágenas	23
3.7 Avaliação dos fatores de crescimento e citocinas	24
3.8 Avaliação das proteínas Smad's	24
3.9 Análise estatística	26
4 RESULTADO	27
4.1 Avaliação clínica da lesão	27
4.2 Avaliação histomorfométrica do fechamento da lesão	28
4.2.1 Avaliação do reparo epitelial e conjuntivo – DRE e DRC	29
4.3 Avaliação da densidade de fibras colágenas.....	30
4.4 Avaliação dos fatores de crescimento e citocinas	31

4.5 Avaliação das proteínas Smad's	34
5 DISCUSSÃO	35
6 CONCLUSÃO	39
REFERÊNCIAS	40
ANEXO	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Confeção da lesão no palato	19
Figura 2 - Equipamento de estimulação elétrica	20
Figura 3 - Fluxo do experimento em dias e eventos	20
Figura 4 - Delimitação da área da lesão	21
Figura 5 - Imagem histológica da lesão com DRE e DRC	22
Figura 6 - Calibração das imagens da polarização.....	23
Figura 7 - Calibração das imagens da imunofluorescência.....	25
Figura 8 - Imunomarcção das proteínas Smad's	26
Figura 9 - Resultados clínicos	27
Figura 10 - Imagem histológica do reparo da lesão	28
Figura 11 - Resultado da DRE e DRC	29
Figura 12 - Fibras colágenas visualizadas por polarização.....	31
Figura 13 - Perfil inflamatório e angiogênico	33

Figura 14 – Imunomarcação para Smad2 e p-Smad2	34
--	----

Ferreira CL. Efeito da estimulação elétrica no processo de reparação de tecido mole no palato: estudo em camundongos [tese]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2020.

RESUMO

A estimulação elétrica (EE) tem sido usada no tratamento de lesões crônicas apresentando resultados favoráveis no fechamento da lesão cutânea entre outras aplicações clínicas. No entanto, a literatura carece de estudos avaliando se os efeitos da EE no fechamento da lesão oral. Diante disso, torna-se relevante investigar os efeitos da EE durante o processo de reparo da lesão oral em camundongos (Swiss). Métodos: Noventa animais foram divididos em grupos: Controle (C; n=45) que receberam a aplicação da EE com o aparelho desligado e Teste (EE; n=45) que receberam a EE (100 μ A; 9 kHz; 660 mVpp; 1x/dia por 3 dias). Uma lesão de espessura total foi realizada com punch de biópsia de 1,5 mm de diâmetro. Os animais foram eutanasiados no 1º, 3º e 5º dia após a confecção da lesão. As amostras foram fixadas em paraformaldeído 4%, descalcificadas em ácido fórmico 20% e emblocadas em parafina. Os parâmetros avaliados foram: fechamento clínico da lesão; distância de reparação epitelial (DRE) e conjuntiva (DRC), concentração de citocinas IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α e VEGF; porcentagem de fibras colágenas e quantificação das proteínas de sinalização Smad2. Resultados: A área de fechamento clínico foi reduzida no grupo EE no 5º dia de avaliação (p=0,01). As DRE e DRC do grupo EE apresentaram menor distância em todos os tempos avaliados (p<0,05) com reduzida concentração de IL-6, TNF- α , IL-10 e VEGF (p<0,05). Não houve diferença na porcentagem de fibras colágenas e na phospho-Smad2. Conclusão: A EE teve efeito positivo nos parâmetros clínicos e histológicos com modulação da resposta inflamatória no início do processo de reparo da lesão.

Palavras-chave: Estimulação elétrica. Mucosa bucal. Cicatrização. Reepitelização. Ferida cirúrgica.

Ferreira CL. Effect of electrical stimulation on soft tissue repair process at the palate: a study in mice [doctorate thesis]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2020.

ABSTRACT

Background: Since Electrical Stimulation (ES) has used for chronic wounds treatment and other clinical applications showing favorable results in wound closure, it was hypothesized whether it could bring good results in oral wound closure. The aim was to investigate the ES effects during the oral wound healing process in mice (Swiss). Methods: Ninety animals were divided in groups: Control (C; n=45) which received a fictitious ES application, i.e. the ES appliance was shutted off and ES (ES; n=45) which received ES (100 μ A; 9 kHz; 660 mVpp) once time a day for 3 days consecutively. A full thickness wound was done using a 1.5 mm diameter biopsy punch in the hard palate. The animals were euthanized on 1st, 3rd and 5th day post-wounding. The samples were fixed, decalcified and embedded in paraffin. The parameters evaluated were: clinical wound closure; distance of epithelial and connective wound edges (EWD and CWD); cytokines (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10), TNF- α and VEGF by multiplex, percentage of collagen fibers and Smad proteins. Results: Clinical wound closure area was reduced on day 5 in ES group ($p = 0.01$). Both EWD and CWD distance were shorter in all times ($p < 0.05$) with a reduction of inflammatory cytokines production ($p < 0.05$). There were no difference in collagen percentage and phospho-Smad2. Conclusion: ES had a positive effect on clinical and histomorphometric wound closure outcomes showing a modulation of inflammatory response in the beginning of wound healing.

Keywords: Electric Stimulation. Mouth mucosa. Wound healing. Re-Epithelialization. Surgical Wound.

1 INTRODUÇÃO

Na medicina, a estimulação elétrica tem sido usada no tratamento de lesões crônicas de diversas origens (Kloth, 2005; Martínez-Rodrigues et al., 2013; Thakral et al., 2013); úlceras de pressão (Barnes et al., 2014), como uma modalidade de terapia no tratamento do câncer (Mun et al., 2018) e entre outras aplicações. A estimulação elétrica é uma energia biofísica não-farmacológica, que contribui para o aumento da taxa de reparo cutâneo, prevenindo a isquemia e a formação de tecido necrótico (Torkaman, 2014). Na odontologia, seus efeitos têm sido investigados em defeitos ósseos (Kaynak et al., 2005), na periodontite (Tomofuji et al., 2013; Puhar et al., 2011) e na movimentação ortodôntica (Spadari et al., 2017).

Sabe-se que a epiderme exibe uma “bateria” natural endógena que gera corrente elétrica quando está lesada e que a aplicação do estímulo elétrico pode mimetizar a corrente no local, iniciando ou acelerando o processo de reparo (McCaig et al., 2005; Zhao et al., 2006; Hunckler, de Mel, 2017). A corrente elétrica quando aplicada na ordem de microampère (μA), também pode ser denominada por microcorrente, bioestimulação ou bioeletricidade, sendo indolor nas variações de 1 a 600 μA , de fácil uso e bom custo-benefício (Puhar et al., 2011; Hunckler, de Mel, 2017). Sua ação no tecido lesionado ativa genes essenciais para o reparo, direcionando a migração celular através de receptores de fator de crescimento epidérmico (EGFR), integrinas, e controlando a eletrotaxia/galvanotaxia por fosfatidilinositol-3-OH quinase gama [PI(3)K γ] e homólogo da tensina (PTEN) (Huttenlocher, Horwitz, 2007; Zhao et al., 2010).

A estimulação dos receptores do fator de crescimento transformante-beta (TGF- β) ativam as proteínas citoplasmáticas Smad's que são translocadas para o núcleo celular regulando a expressão de genes alvos (Heldin et al., 1997;

Massagué, 2000), tendo a via de sinalização TGF- β /Smad importante função durante o processo de reparo (O’Kane, Ferguson, 1997; Yoneda et al., 2013;). Estudos prévios apontaram que as Smad’s podem atuar como reguladoras de proliferação e/ou inibição epitelial (Tomikawa et al., 2012; Yoneda et al., 2013, Shimoe et al., 2014). Quando fosforiladas, incorporam-se aos complexos transcricionais podendo ativar ou suprimir genes alvos (Derynck et al., 1998; Massagué, Wotton, 2000;). A Smad2 e a Smad3 atuam sob o controle da via TGF- β /Activina/nodal, sofrendo constante deslocamento nucleocitoplasmático para a formação de diferentes complexos proteicos nucleares. (Kang et al., 2003; Inman et al., 2002; Heldin et al., 1997; Massagué, 2000).

Naturalmente, a regulação das fases do reparo compreende uma variedade de fatores de crescimento, citocinas e hormônios (Singer, Clark, 1999; Werner, Grose, 2003). Sendo um processo dinâmico envolvendo a coagulação, inflamação, proliferação celular, deposição de matriz extracelular e remodelação tecidual (Martin, 1997; Singer, Clark, 1999) resultando na restauração da continuidade, da funcionalidade e aparência do tecido. A lesão aguda tem seu curso de reparo seguindo uma ordem dada pela sequência de eventos biológicos que ocorre no tecido assim como pelo tempo de restauração desta. Este tempo é relativo, pois é determinado pela natureza e grau do processo patológico, do status do hospedeiro e do ambiente (Lazarus et al., 1994). A reepitelização da lesão, cujo objetivo é criar uma barreira de proteção ao tecido desnudo, depende da migração e proliferação de queratinócitos, que ocorre dentro de poucas horas após a lesão tecidual (Clark, 1986; Velnar et al., 2009). Inicialmente, uma única camada de células epiteliais da margem da lesão migra através da matriz provisória rica em fibrina, fibronectina e colágeno tipo IV, até se encontrarem, seguido pela estratificação do epitélio e a restauração da membrana basal. (Velnar et al., 2009; Li et al., 2007).

Visto que existe a presença inata da corrente elétrica no local lesionado,

a estimulação elétrica atua nas várias fases do reparo, através da síntese de proteínas, e na migração celular de neutrófilos, macrófagos, linfócitos, fibroblastos e queratinócitos, mostrando-se eficaz no fechamento da lesão nos estudos em animais (Cheing et al., 2014; Demir et al., 2004; Kloth, 2005; Reger et al., 1999) e clínicos (Martínez-Rodrigues et al., 2013; Barnes et al., 2014).

As lesões orais possuem rápida evolução e formação reduzida de cicatriz comparada com lesões cutâneas (Szpaderska et al., 2003), provavelmente devido a presença da saliva que contém citocinas, fatores de crescimento e inibidores de proteases (Zelles et al., 1995) e pela diferença na resposta genética da mucosa oral ao ferimento (Chen et al., 2010). Apesar dessa característica da mucosa oral, a investigação da estimulação elétrica é relevante pois pode influenciar positivamente a qualidade do reparo, melhorando os resultados clínicos nos procedimentos de cirurgia plástica periodontal, em que a estética é um fator primordial e a remoção de enxerto se faz necessário (Chambrone, Tatakis, 2015; Kim, Neiva, 2015; Santamaria et al., 2017)

Como visto, a literatura apresenta diversos benefícios do uso da estimulação elétrica no processo de reparo de lesões cutâneas, no entanto, não há referências até o momento sobre seus efeitos no reparo da mucosa oral, em especial, em lesões do palato duro, que é revestido por mucosa mastigatória. Assim, o objetivo foi investigar se a EE atuaria positivamente no reparo inicial da mucosa oral através da variável primária, fechamento da lesão.

6 CONCLUSÃO

A estimulação elétrica, dentro do protocolo proposto, apresentou efeito significativo no fechamento da lesão, modulando a resposta inflamatória e apresentando menor área de lesão clínica.

REFERÊNCIAS*

- Barnes R, Shahin Y, Gohil R, Chetter I. Electrical stimulation vs. standard care for chronic ulcer healing: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *Eur J Clin Invest*. 2014 Apr;44(4):429-40. doi: 10.1111/eci.12244.
- Basso FG, Pansani TN, Turrioni AP, Soares DG, de Souza Costa CA, Hebling J. Tumor Necrosis Factor- α and Interleukin (IL)-1 β , IL-6, and IL-8 impair in vitro migration and induce apoptosis of gingival fibroblasts and epithelial cells, delaying wound healing. *J Periodontol*. 2016 Aug;87(8):990-6. doi: 10.1902/jop.2016.150713.
- Chambrone L, Tatakis DN. Periodontal soft tissue root coverage procedures: a systematic review from the AAP Regeneration Workshop. *J Periodontol*. 2015;86(2 Suppl):S8–S51. doi:10.1902/jop.2015.130674
- Cheing GL, Li X, Huang L, Kwan RL, Cheung KK. Pulsed electromagnetic fields (PEMF) promote early wound healing and myofibroblast proliferation in diabetic rats. *Bioelectromagnetics*. 2014 Apr;35(3):161-9. doi: 10.1002/bem.21832.
- Chen L, Arbieva ZH, Guo S, Marucha PT, Mustoe TA, DiPietro LA. Positional differences in the wound transcriptome of skin and oral mucosa. *BMC Genomics*. 2010 Aug 12;11:471. doi: 10.1186/1471-2164-11-471.
- Clark RAF. The molecular and cellular biology of wound repair. New York, NY: Springer. 1986.
- Demir H, Balay H, Kirnap M. A comparative study of the effects of electrical stimulation and laser treatment on experimental wound healing in rats. *J Rehabil Res Dev*. 2004 Mar;41(2):147-54. doi: 10.1682/jrrd.2004.02.0147
- Derynck R, Zhang Y, Feng XH. Smads: transcriptional activators of TGF-beta responses. *Cell*. 1998 Dec 11;95(6):737-40. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81696-7

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [cited 2019 Jan 2019]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

DiPietro LA. Angiogenesis and wound repair: when enough is enough. *J Leukoc Biol.* 2016;100(5):979-84. doi: 10.1189/jlb.4MR0316-102R

Eming SA, Werner S, Bugnon P, Wickenhauser C, Siewe L, Utermöhlen O, et al. Accelerated wound closure in mice deficient for interleukin-10. *Am J Pathol.* 2007 Jan;170(1):188-202. doi: 10.2353/ajpath.2007.060370

Guo S, DiPietro LA. Factors affecting wound healing. *J Dent Res.* 2010 Mar;89(3):219-29. doi: 10.1177/0022034509359125.

Häkkinen L, Uitto VJ, Larjava H. Cell biology of gingival wound healing. *Periodontol* 2000. 2000;24:127-52.

Hammad HM, Hammad MM, Abdelhadi IN, Khalifeh MS. Effects of topically applied agents on intra-oral wound healing in a rat model: a clinical and histomorphometric study. *Int J Dent Hyg.* 2011;9(1):9-16. doi: 10.1111/j.1601-5037.2009.00410.x.

Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature.* 1997 Dec 4;390(6659):465-71. doi: 10.1038/37284

Hunckler J, de Mel A. A current affair: electrotherapy in wound healing. *J Multidiscip Healthc.* 2017 Apr 20;10:179-94. doi: 10.2147/JMDH.S127207.

Huttenlocher A, Horwitz AR. Wound healing with electric potential. *N Engl J Med.* 2007 Jan 18;356(3):303-4. doi: 10.1056/NEJMcibr066496

Inman GJ, Nicolás FJ, Hill CS. Nucleocytoplasmic shuttling of Smads 2, 3, and 4 permits sensing of TGF-beta receptor activity. *Mol Cell.* 2002 Aug;10(2):283-94. doi: 10.1016/s1097-2765(02)00585-3

Kang Y, Chen CR, Massagué J. A self-enabling TGF-beta response coupled to stress signaling: Smad engages stress response factor ATF3 for Id1 repression in epithelial cells. *Mol Cell.* 2003 Apr;11(4):915-26. doi: 10.1016/s1097-2765(03)00109-6

Kaynak D, Meffert R, Günhan M, Günhan O. A histopathologic investigation on the effects of electrical stimulation on periodontal tissue regeneration in experimental bony defects in dogs. *J Periodontol.* 2005 Dec;76(12):2194-204. doi: 10.1902/jop.2005.76.12.2194

Keswani SG, Balaji S, Le LD, Leung A, Parvadia JK, Frischer J, et al. Role of salivary vascular endothelial growth factor (VEGF) in palatal mucosal wound healing. *Wound Repair Regen.* 2013 Jul-Aug;21(4):554-62. doi: 10.1111/wrr.12065.

Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: The ARRIVE guidelines for reporting animal research. *Pharmacol Pharmacother.* 2010 Jul;1(2):94-9. doi:10.4103/0976500X.72351.

Kilkenny C, Browne W, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG; National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of animals in research. Animal research: reporting in vivo experiments--the ARRIVE guidelines. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2011 Apr;31(4):991-3. doi: 10.1038/jcbfm.2010.220.

Kim DM, Neiva R. Periodontal soft tissue non-root coverage procedures: a systematic review from the AAP Regeneration Workshop. *J Periodontol.* 2015;86(2 Suppl):S56–S72. doi:10.1902/jop.2015.130684

Kloth LC. Electrical stimulation for wound healing: a review of evidence from in vitro studies, animal experiments, and clinical trials. *Int J Low Extrem Wounds.* 2005 Mar;4(1):23-44. doi: 10.1177/1534734605275733

Larjava H, Wiebe C, Gallant-Behm C, Hart DA, Heino J, Häkkinen L. Exploring scarless healing of oral soft tissues. *J Can Dent Assoc.* 2011;77:b18. PMID: 21366956

Lazarus GS, Cooper DM, Knighton DR, Margolis DJ, Pecoraro RE, Rodeheaver G, et al. Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing. *Arch Dermatol.* 1994 Apr;130(4):489-93. Review. PMID: 8166487

Li J, Chen J, Kirsner R. Pathophysiology of acute wound healing. *Clin Dermatol.* 2007 Jan-Feb;25(1):9-18. doi: 10.1016/j.clindermatol.2006.09.007

Martin P. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science.* 1997 Apr 4;276(5309):75-81. doi: 10.1126/science.276.5309.75

Martínez-Rodríguez A, Bello O, Fraiz M, Martinez-Bustelo S. The effect of alternating and biphasic currents on humans' wound healing: a literature review. *Int J Dermatol*. 2013 Sep;52(9):1053-62. doi:10.1111/j.13654632.2012.05836.x. Review.

Massagué J, Wotton D. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *EMBO J*. 2000;19(8):1745-54. doi: 10.1093/emboj/19.8.1745

Massagué J. How cells read TGF-beta signals. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2000;1(3):169-78. doi: 10.1038/35043051

McCaig CD, Rajnicek AM, Song B, Zhao M. Controlling cell behavior electrically: current views and future potential. *Physiol Rev*. 2005 Jul;85(3):943-78. doi: 10.1152/physrev.00020.2004

Mun EJ, Babiker HM, Weinberg U, Kirson ED, Von Hoff DD. Tumor-treating fields: A fourth modality in cancer treatment. *Clin Cancer Res*. 2018 Jan 15;24(2):266-75. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-1117.

O'Kane S, Ferguson MW. Transforming growth factor beta s and wound healing. *Int J Biochem Cell Biol*. 1997 Jan;29(1):63-78. doi: 10.1016/s1357-2725(96)00120-3

Puhar I, Kapudija A, Kasaj A, Willershausen B, Zafiropoulos GG, Bosnjak A, et al. Efficacy of electrical neuromuscular stimulation in the treatment of chronic periodontitis. *J Periodontal Implant Sci*. 2011 Jun;41(3):117-22. doi: 10.5051/jpis.2011.41.3.117.

Reger SI, Hyodo A, Negami S, Kambic HE, Sahgal V. Experimental wound healing with electrical stimulation. *Artif Organs*. 1999 May;23(5):460-2. doi: 10.1046/j.1525-1594.1999.06365.x

Santamaria MP, Fernandes-Dias SB, Araújo CF, Neves FLS, Mathias IF, Andere NMRB, et al. 2-year assessment of tissue biostimulation with low-level laser on the outcomes of connective tissue graft in the treatment of single gingival recession: A randomized clinical trial. *J Periodontol*. 2017;88(4):320–8. doi:10.1902/jop.2016.160391

Sato Y, Ohshima T, Kondo T. Regulatory role of endogenous interleukin-10 in cutaneous inflammatory response of murine wound healing. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999 Nov;265(1):194-9. doi: 10.1006/bbrc.1999.1455

Shimoe M, Yamamoto T, Shiomi N, Tomikawa K, Hongo S, Yamashiro K, et al. Overexpression of Smad2 inhibits proliferation of gingival epithelial cells. *J Periodontal Res.* 2014 Jun;49(3):290-8. doi: 10.1111/jre.12106.

Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med.* 1999;341:738-46. doi: 10.1056/NEJM199909023411006

Spadari GS, Zaniboni E, Vedovello SA, Santamaria MP, do Amaral ME, Dos Santos GM, et al. Electrical stimulation enhances tissue reorganization during orthodontic tooth movement in rats. *Clin Oral Investig.* 2017 Jan;21(1):111-20. doi: 10.1007/s00784-016-1759-6

Szpadarska AM, Zuckerman JD, DiPietro LA. Differential injury responses in oral mucosal and cutaneous wounds. *J Dent Res.* 2003 Aug;82(8):621-6. PubMed PMID: 12885847 doi: 10.1177/154405910308200810

Szpadarska AM, Walsh CG, Steinberg MJ, DiPietro LA. Distinct patterns of angiogenesis in oral and skin wounds. *J Dent Res.* 2005 Apr;84(4):309-14. doi: 10.1177/154405910508400403

Thakral G, Lafontaine J, Najafi B, Talal TK, Kim P, Lavery LA. Electrical stimulation to accelerate wound healing. *Diabet Foot Ankle.* 2013 Sep 16;4. doi: 10.3402/dfa.v4i0.22081

Tomikawa K, Yamamoto T, Shiomi N, Shimoe M, Hongo S, Yamashiro K, et al. Smad2 decelerates re-epithelialization during gingival wound healing. *J Dent Res.* 2012 Aug;91(8):764-70. doi: 10.1177/0022034512451449.

Tomofuji T, Ekuni D, Azuma T, Irie K, Endo Y, Kasuyama K, et al. Effects of electrical stimulation on periodontal tissue remodeling in rats. *J Periodontal Res.* 2013 Apr;48(2):177-83. doi: 10.1111/j.1600-0765.2012.01518.x.

Torkaman G. Electrical stimulation of wound healing: A review of animal experimental evidence. *Adv Wound Care (New Rochelle).* 2014 Feb 1;3(2):202-18. doi: 10.1089/wound.2012.0409

Uitto VJ, Airola K, Vaalamo M, Johansson N, Putnins EE, Firth JD, et al. Collagenase-3 (matrix metalloproteinase-13) expression is induced in oral mucosal epithelium during chronic inflammation. *Am J Pathol.* 1998 Jun;152(6):1489-99.

Velmar T, Bailey T, Smrkolj V. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *J Int Med Res.* 2009 Sep-Oct;37(5):1528-42. doi: 10.1177/147323000903700531

Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev.* 2003 Jul;83(3):835-70. doi: 10.1152/physrev.2003.83.3.835

Yoneda N, Yasue A, Watanabe T, Tanaka E. Down-regulation of Smad3 accelerates palatal wound repair. *J Dent Res.* 2013 Aug;92(8):716-20. doi:10.1177/0022034513491575.

Zelles T, Purushotham KR, Macauley SP, Oxford GE, Humphreys-Beher MG. Saliva and growth factors: the fountain of youth resides in us all. *J Dent Res.* 1995 Dec;74(12):1826-32. doi: 10.1177/00220345950740120301

Zhao M, Song B, Pu J, Wada T, Reid B, Tai G, et al. Electrical signals control wound healing through phosphatidylinositol-3-OH kinase-gamma and PTEN. *Nature.* 2006 Jul 27;442(7101):457-60. doi: 10.1038/nature04925

Zhao M, Penninger J, Isseroff RR. Electrical activation of wound-healing pathways. *Adv Skin Wound Care.* 2010 Jan 1;1:567-73. doi:10.1089/9781934854013.567

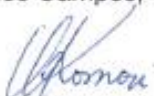
ANEXO – Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais



CERTIFICAMOS, que o protocolo registrado sob o nº 02/2017, intitulado:- "Efeito da estimulação elétrica no processo de reparação de tecido mole no palato: Estudo histológico em camundongos " sob a responsabilidade de **MARIA APARECIDA NEVES JARDINI**, tendo como colaboradora Camila Lopes Ferreira, e que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as Normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA – ICT – CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS-UNESP)**, em reunião de 07/04/2017.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	03/07/2017 a 21/12/2018
Espécie/linhagem/raça	Camundongos Mus musculus, Swiss
Nº de Animais	60
Peso/Idade	20 a 40 grs
Sexo	MACHO
Origem	Biotério Central – Campus de Botucatu-UNESP

São José dos Campos, 10 de abril de 2017


 Profa.Dra. **PAULA CAROLINA KOMORI DE CARVALHO**
 Coordenadora