



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 Jardim (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-Sanduiche 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 - Confecção 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 - Imunomarcacão 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 been 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 shut 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.

2 PROPOSIÇÃO

Este estudo avaliou os efeitos da estimulação elétrica no processo de reparo tecidual em lesões cirúrgicas abertas no palato duro, nos seguintes parâmetros:

- a) avaliação clínica da lesão, por análise fotográfica;
- b) fechamento da lesão, por histomorfometria;
- c) densidade das fibras colágenas, por microscopia de polarização;
- d) avaliação da concentração fatores de crescimento (TNF- α e VEGF) e citocinas (IL-1 β ; IL-6 e IL-10);
- e) avaliação das proteínas Smad's, por imunofluorescência.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostra

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA – ICT- Campus de São José dos Campos – UNESP) - protocolo n° 02/2017 e segue as diretrizes do ARRIVE Guidelines (Kilkenny et al., 2010; Kilkenny et al., 2011). O modelo experimental foi composto por camundongos (*Mus musculus*, Swiss) machos adultos, com idade entre 16 a 18 semanas. Os animais foram mantidos no biotério da própria faculdade, em gaiolas plásticas em rack ventilado, na proporção de cinco animais por gaiola. Estas foram forradas com raspa de madeira seca (maravalha de pinus) substituída em dias alternados, proporcionando as condições de higiene necessárias ao bem-estar e à saúde dos animais. Os animais receberam suprimento constante de água potável e foram alimentados com dieta padrão, fornecida à vontade.

3.1.1 Tamanho da amostra

O tamanho da amostra foi definido considerando-se poder de 80% e α de 0,05 para se achar uma diferença de 40 μ m entre os grupos para o parâmetro de fechamento da lesão. Para tal, 10 animais seriam necessários para cada subgrupo, de acordo com estudos prévios (Tomikawa et al., 2012 e Keswani et al., 2013).

3.1.2 Distribuição da amostra

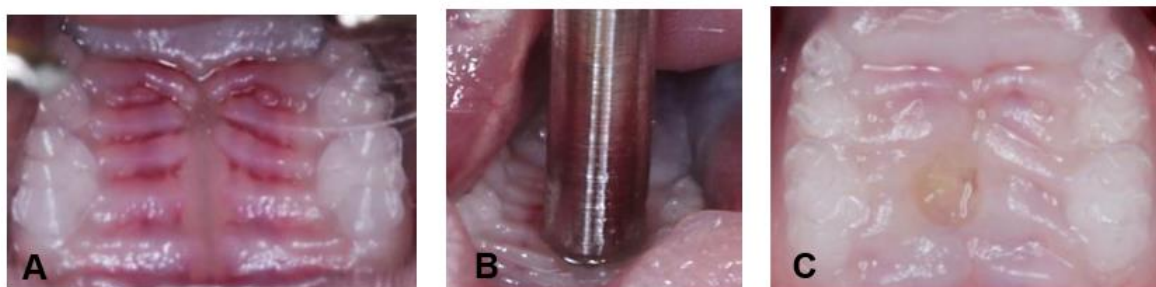
Foram utilizados 90 camundongos, divididos em:

- a) Controle (C; n=45): animais que receberam a aplicação do EE com o gerador de corrente desligado;
- b) Estímulo Elétrico (EE; n=45): animais que receberam a aplicação do EE

3.2 Confeção da lesão no palato

Para a realização da lesão no palato (Figura 1), os animais foram anestesiados com a associação do anestésico cloridrato de quetamina (90-150 mg/kg; IP), (Dopalen, da marca Vetbrands, Jacaréí, Brasil) e relaxante muscular cloridrato de xilazina (7.5-16 mg/kg; IP), (Anasedan, da marca Vetbrands, Jacaréí, Brasil). Em seguida, uma lesão de espessura total foi confeccionada por meio de um punch de biópsia de 1,5 mm (Integra Miltex) no centro do palato duro entre os molares superiores (Tomikawa et al., 2012).

Figura 1 - Confecção da lesão no palato



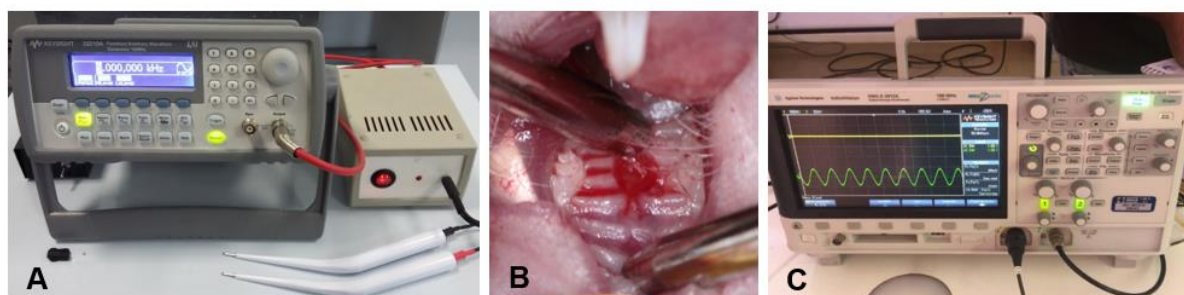
Legenda: Imagem fotográfica do palato (A), confecção da lesão com punch cirúrgico (B) e imediatamente após a eutanásia (C).

Fonte: Elaborada pelo autor.

3.3 Estimulação elétrica

Um gerador de corrente elétrica e um condutor foi montado para a aplicação da estimulação elétrica (Figura 2). A escolha dos parâmetros da corrente elétrica foi adaptada de Tomofuji et al. (2013), tendo-se: corrente elétrica de $100\mu\text{A}$, com frequência 9 kHz e 660 mVpp, com aplicação de 30 segundos. Dois eletrodos foram posicionados anterior e posteriormente as bordas da lesão para a aplicação do estímulo elétrico. A corrente elétrica foi otimizada visualmente por meio de um osciloscópio. Os animais do grupo C passaram pelo mesmo procedimento, no entanto, o aparelho estava desligado.

Figura 2 - Equipamento de estimulação elétrica



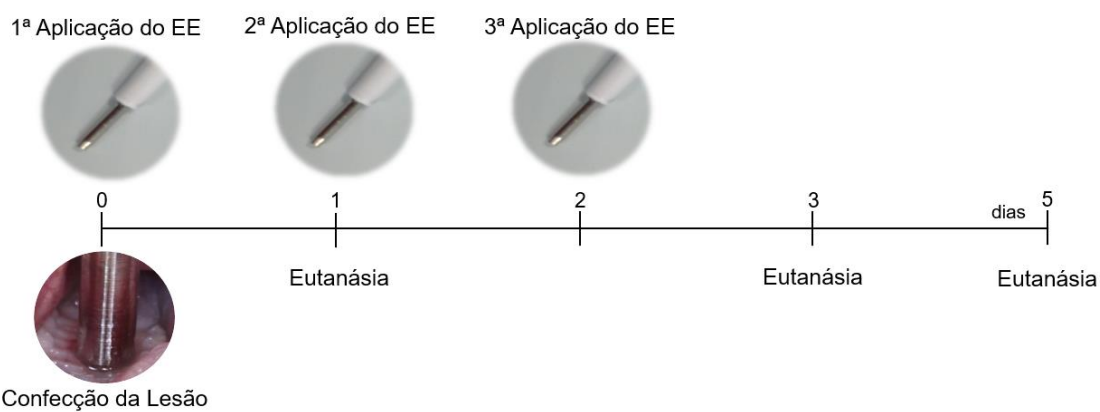
Legenda: Gerador de corrente elétrica com os eletrodos (A), posicionamento dos eletrodos durante a aplicação da EE (B) e osciloscópio (C).

Fonte: Elaborada pelo autor.

3.4 Período experimental

Os grupos C e EE receberam seus respectivos tratamentos logo após a confecção da lesão, no 1º e 2º dia pós lesão, uma vez ao dia e no mesmo horário (Figura 3).

Figura 3 - Fluxo do experimento em dias e eventos

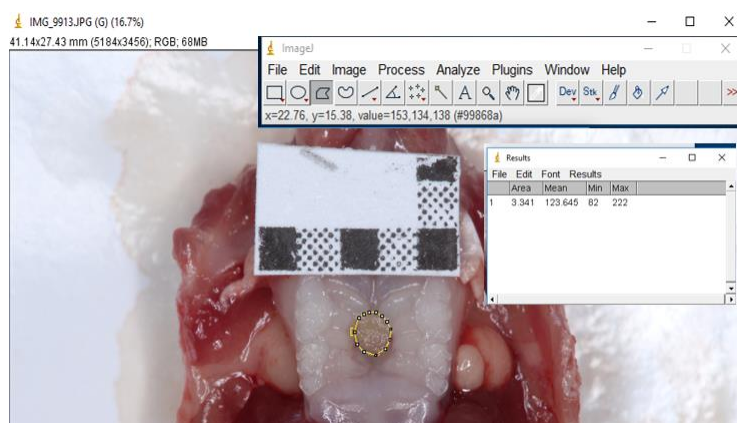


Fonte: Elaborada pelo autor.

3.5 Avaliação fotográfica da lesão

Imagens fotográficas das lesões foram obtidas no 1º, 3º e 5º dia, imediatamente após a eutanásia. Para a obtenção das imagens (Hammad et al., 2011), cada espécime foi fotografado com uma régua de 1x1 mm, servindo como escala de referência. A área de superfície de cada lesão foi avaliada por meio do programa computacional de domínio público ImageJ 1.49v. Após a calibração no programa, a área da lesão foi delimitada pelas bordas com a ferramenta “*Polygon Selections*” e obtido valor da área de cada amostra (Figura 4).

Figura 4 - Delimitação da área da lesão



Fonte: Elaborada pelo autor.

3.6 Preparo e processamento dos espécimes

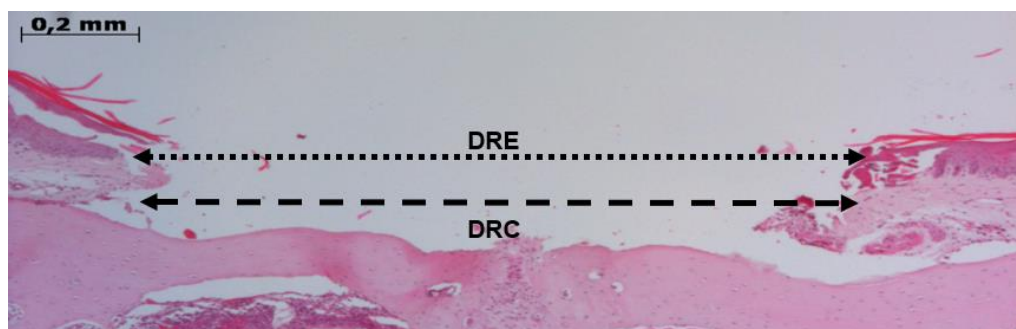
Após a conclusão do período experimental, foi realizada a eutanásia dos

animais. As amostras foram armazenadas em solução de paraformaldeído a 4% tamponado por 48 horas, descalcificadas com ácido fórmico 20% por três dias e incluídas em parafina. Em cada amostra foi avaliado 3 cortes semisseriados de 5 μ m obtido do terço médio de maior diâmetro da lesão e corado com hematoxilina e eosina (H&E). As fotomicrografias dos cortes foram captadas por câmera acoplada ao microscópio Axioplan 2 e o programa de aquisição de imagens Axiovision Rel 4.7. As imagens foram renomeadas para o devido cegamento do examinador e analisadas pelo ImageJ.

3.6.1 Análise morfométrica do fechamento da lesão

As secções coradas em H&E foram submetidas à análise do fechamento da lesão (Tomikawa et al., 2012) As distâncias entre as bordas de reparação do epitélio e do tecido conjuntivo foram definidas como distância de reparação epitelial (DRE) e distância de reparação conjuntiva (DRC), respectivamente (Figura 5).

Figura 5 - Imagem histológica da lesão com DRE e DRC



Legenda: Distância da reparação epitelial (DRE), distância da reparação conjuntiva (DRC). Coloração HE, aumento de 50x.

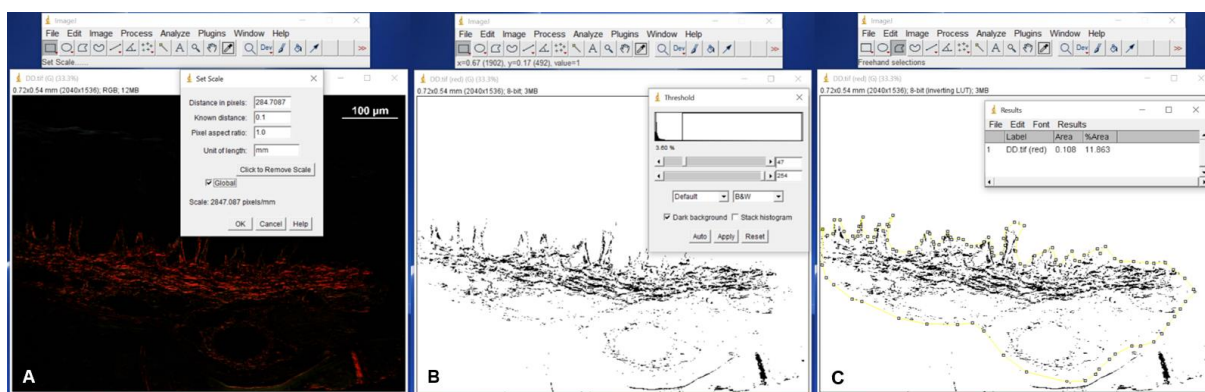
Fonte: Elaborada pelo autor.

3.6.2 Avaliação da densidade de fibras colágenas

Foram utilizados dois cortes por lesão (n=7) usando coloração de Picrosirius-Red sob microscopia de polarização para a avaliação do conteúdo de colágeno nas bordas da lesão, seguindo método adaptado de Tomikawa et al. (2012).

As imagens cegadas foram avaliadas pelo ImageJ. Uma escala padrão foi inserida neste programa (Figura 6A). Todas as imagens foram avaliadas pelo canal “red” do sistema de cores RGB (*Red, Green, Blue*), utilizando “*threshold*” previamente definido (Figura 6B). A área da borda da lesão foi delimitada de acordo com a disposição do tecido conjuntivo de cada borda e a porcentagem de colágeno nesta área foi avaliada (Figura 6C).

Figura 6 - Calibração das imagens da polarização



Legenda: Inserção da escala padrão (A), definição do threshold (B) e delimitação da área (C).

Fonte: Elaborada pelo autor.

3.7 Avaliação dos fatores de crescimento e citocinas

O tecido mole dentro e ao redor da lesão foi coletado de 5 animais por subgrupo, e armazenado em solução PBS tamponado a -80°C. IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α e VEGF foram detectados pelo kit comercial de camundongos (MCYTOMAG-70K-05, Mouse Cytokine MAGNETIC Kit, Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) e analisados pelo sistema Luminex (MiraiBio, Alameda, CA, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Estes ensaios foram realizados no laboratório da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP-Unicamp, SP). As concentrações das amostras foram estimadas a partir da curva-padrão e expressas em pg/ml.

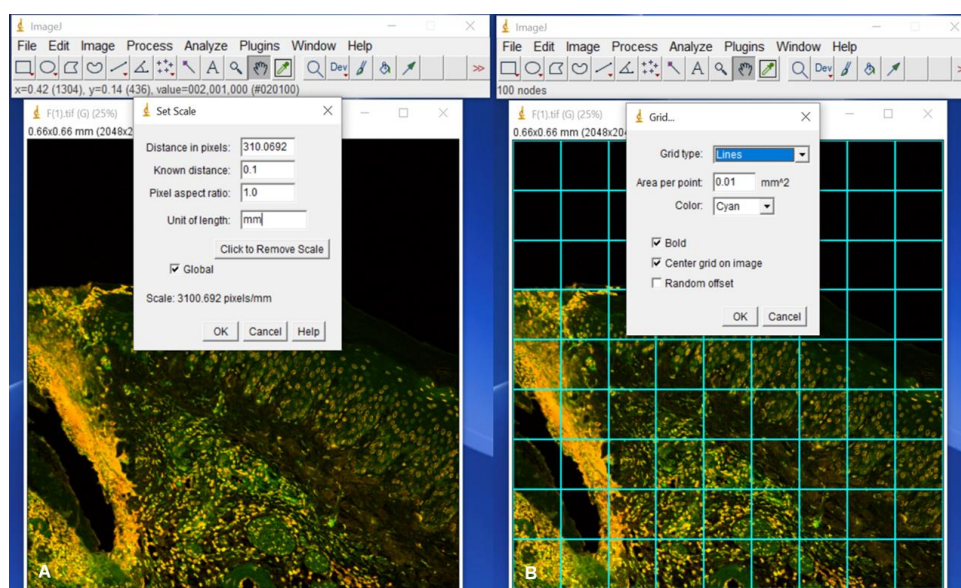
3.8 Avaliação das proteínas Smad's

A detecção das proteínas Smad2 e phospho-Smad2 (p-Smad2) foi realizada por meio da técnica de imunofluorescência em tecido epitelial com o objetivo de avaliar a presença dessas proteínas de sinalização em relação ao tratamento com estímulo elétrico. Foi selecionado um corte por lesão (n=7) para cada anticorpo. Os cortes foram desparafinizados e hidratados com banhos decrescentes de álcoois. A recuperação antigênica foi realizada com solução tampão de citrato em micro-ondas por 20 minutos. Foi realizado 3 banhos de PBS 1% e aplicado sobre o corte solução de Triton 0.1%+PBS 1%+BSA 3% por 60 minutos para o bloqueio de background. Em seguida, foram aplicados os anticorpos policlonais Smad2 (1:400; ThermoFisher Scientific PA5-85297) e p-Smad2 (1:400; ThermoFisher Scientific 44-244G) associado ao anticorpo

histona 4 (H4;1:400; Cell Signaling Technology #2935) para a marcação nuclear e incubados overnight à temperatura de 4 °C. Após a incubação dos anticorpos primários, as lâminas foram lavadas com PBS 1% e a incubação dos anticorpos secundários Alexafluor 488 (1:200; ThermoFisher Scientific A-21206) e Alexafluor 555 (1:200; ThermoFisher Scientific # A-21422) foi realizada em temperatura ambiente por 1 hora. Em seguida, os cortes foram banhados novamente com PBS 1% e as lâminas montadas foram mantidas em ambiente escuro à 4 °C. Os cortes foram visualizados em microscópio confocal e as imagens foram capturadas pelo programa computacional NIS elemento no aumento de 20x.

As imagens cegadas foram avaliadas pelo ImageJ. Uma escala padrão foi inserida neste programa, seguido por um grid de 0,1 mm² (Figura 7). Foram definidos três grids a partir da borda da lesão no aumento de 150% para a contagem das células epiteliais marcadas positivamente.

Figura 7 - Calibração das imagens da imunofluorescência

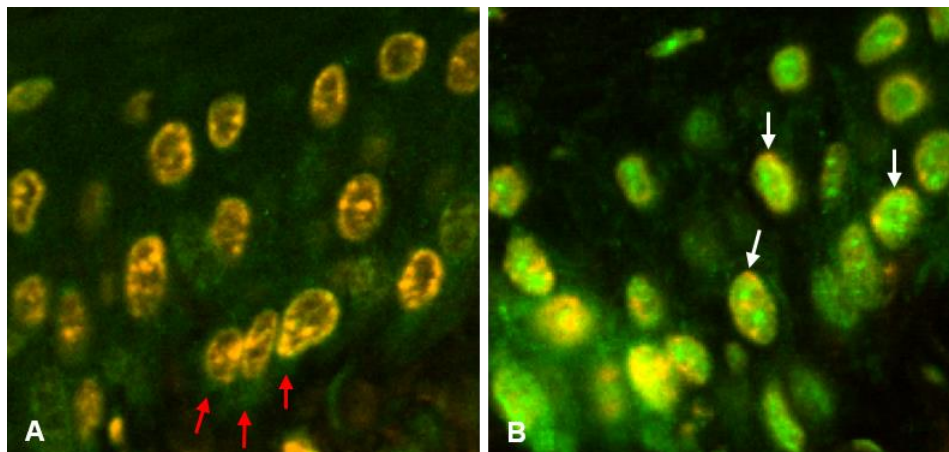


Legenda: Inserção da escala padrão (A) e grid (B).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para a proteína Smad2 foi considerada a marcação citoplasmática, enquanto que a p-Smad2 somente a nuclear (Figura 8).

Figura 8 - Imunomarcação das proteínas Smad's



Legenda: Imunomarcação Smad2 (A) e p-Smad2 (B). Setas vermelhas apontam a marcação citoplasmática. Setas brancas apontam a marcação nuclear.
Fonte: Elaborada pelo autor.

3.9 Análise estatística

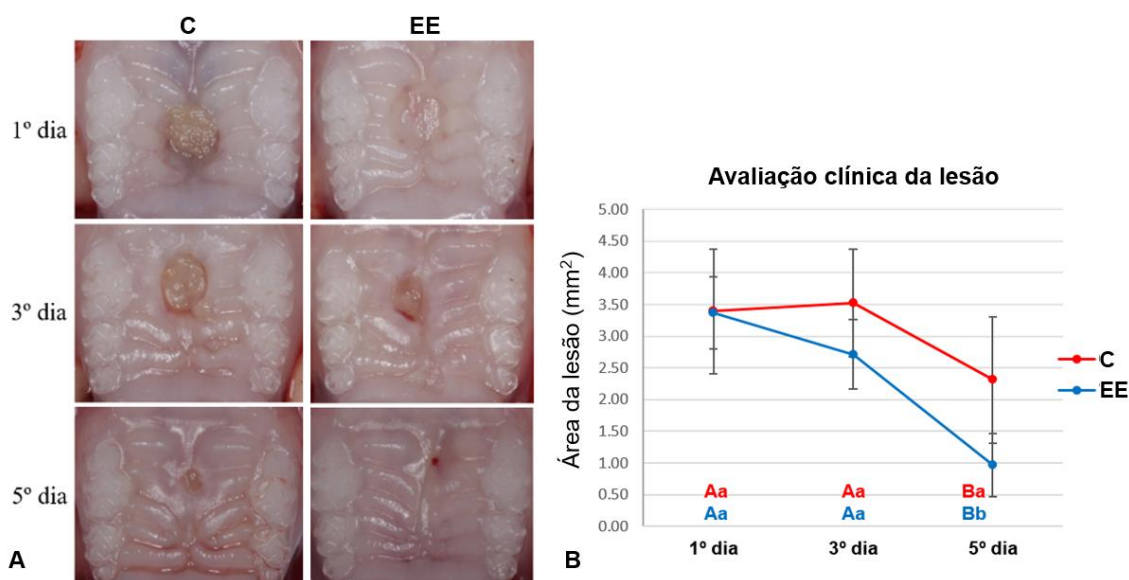
As análises foram realizadas sem o conhecimento prévio dos grupos em avaliação. Para a calibração do examinador foi aplicado o teste de Pearson ($r > 0.9$). A estatística descritiva incluiu o cálculo das médias e desvio padrões com nível de significância de 5%. Os testes de normalidade de Shapiro-Wilk e de homogeneidade de Brown-Forsythe foram feitos antes da aplicação do teste de análise de variância - 2 fatores, seguido pelo teste de Tukey para as análises intergrupo e intragrupo.

4 RESULTADO

4.1 Avaliação clínica da lesão

Os grupos C e EE não apresentaram diferença quando comparado o 1º e o 3º dia de reparo ($p=0,9$ para C e $p=0,3$ para EE). No 5º dia, a área da lesão foi menor em relação aos dias anteriores em ambos os grupos ($p=0,04$ para C e $p=0,0001$ para EE). Nesse mesmo período, o grupo EE apresentou menor área de reparo em relação ao grupo C ($p=0,01$) (Figura 9).

Figura 9 - Resultados clínicos

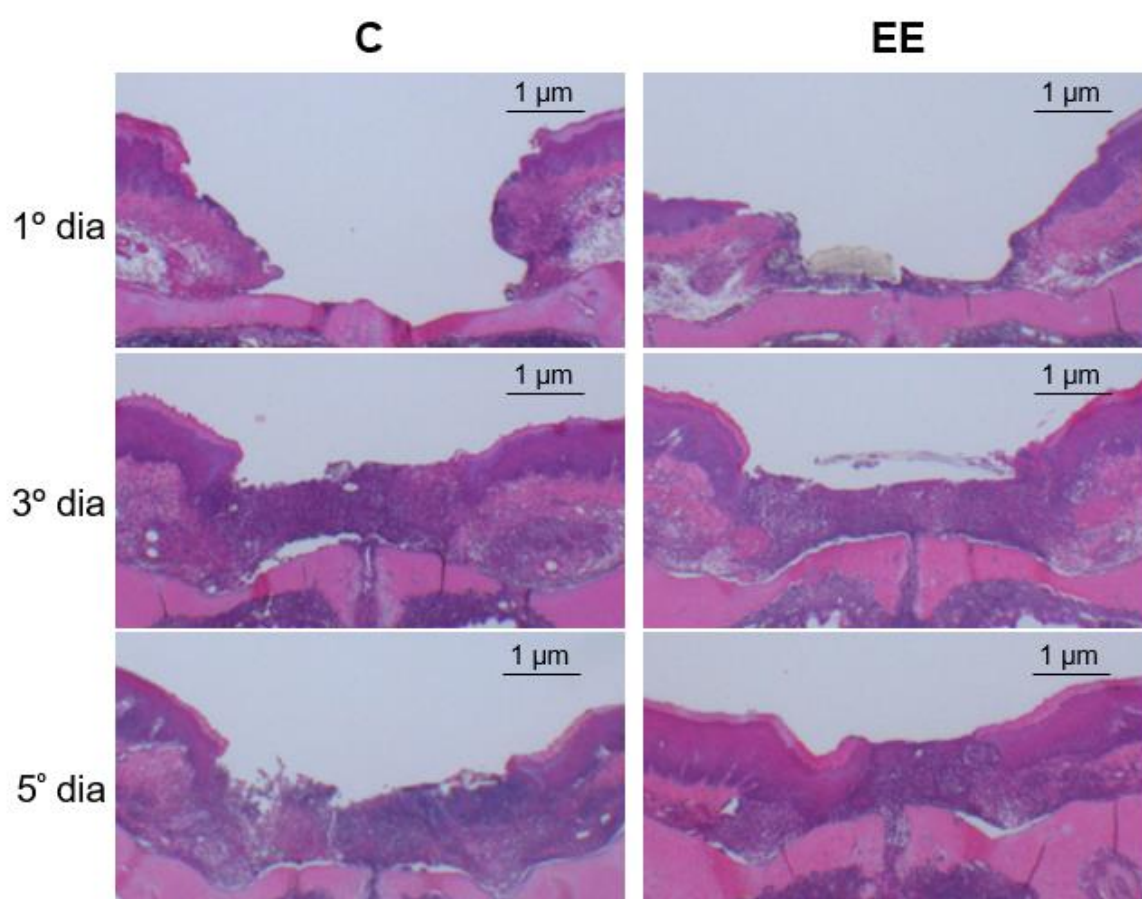


Legenda: Imagem ilustrativa do reparo (A) e avaliação clínica da lesão (B). Letras maiúsculas diferentes - horizontal: diferença significativa na comparação intragrupo – ANOVA 2 fatores. Letras minúsculas diferentes - vertical: diferença significativa na comparação intergrupo – ANOVA 2 fatores. Fonte: Elaborada pelo autor.

4.2 Avaliação histomorfométrica do fechamento da lesão

A evolução da DRE e DRC ao longo dos períodos avaliados pode ser observada na Figura 10. Os resultados de cada avaliação são apresentados a seguir.

Figura 10 - Imagem histológica do reparo da lesão



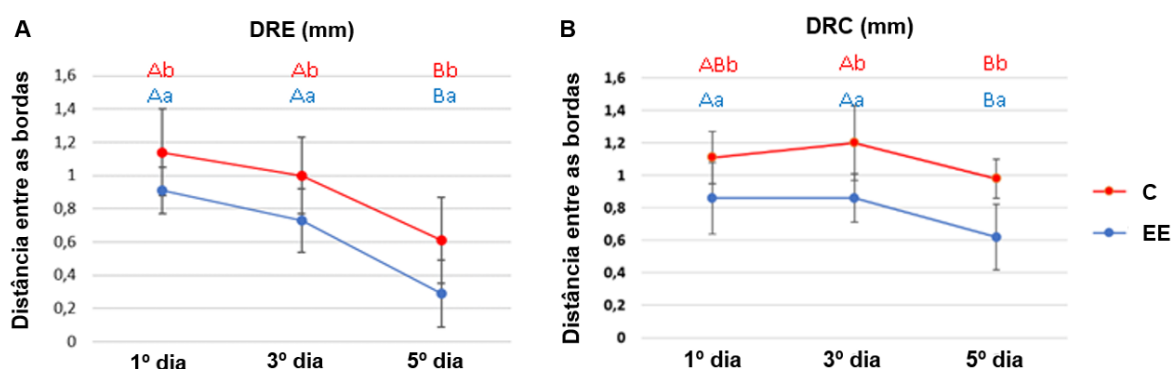
Legenda: Coloração HE.

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.2.1 Avaliação do reparo epitelial e conjuntivo – DRE e DRC

Os grupos C e EE apresentaram padrão de fechamento epitelial decrescente ao longo dos dias, sendo menor ao 5º dia comparado com o 1º e 3º dia ($p < 0,001$). No entanto, o grupo EE apresentou menor DRE em relação ao grupo C em todos os períodos avaliados ($p = 0,023$; $p = 0,006$; $p = 0,002$) (Figura 11A). Quanto DRC, o grupo EE foi significativo ao 5º dia comparado com o 1º e 3º dia ($p = 0,012$). Além disso, apresentou menor DRC em relação ao C nos tempos avaliados ($p = 0,003$, $p < 0,001$; $p < 0,001$). O grupo C não apresentou o mesmo perfil de reparo, apresentando redução entre o 3º e 5º dia ($p = 0,025$) porém com resultados semelhantes ao 1º dia ($p = 0,22$) (Figura 11B).

Figura 11 - Resultado da DRE e DRC



Legenda: Fechamento do reparo epitelial (A) e conjuntivo (B). Letras maiúsculas – horizontal: diferença significativa na comparação intragrupo – ANOVA 2 fatores. Letras minúsculas – vertical: diferença estatisticamente significativa na comparação intergrupo – ANOVA 2 fatores.

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.3 Avaliação da densidade de fibras colágenas

O grupo EE não foi significativo comparado ao C na porcentagem de colágeno nas bordas da lesão (Tabela 1 e Figura 12).

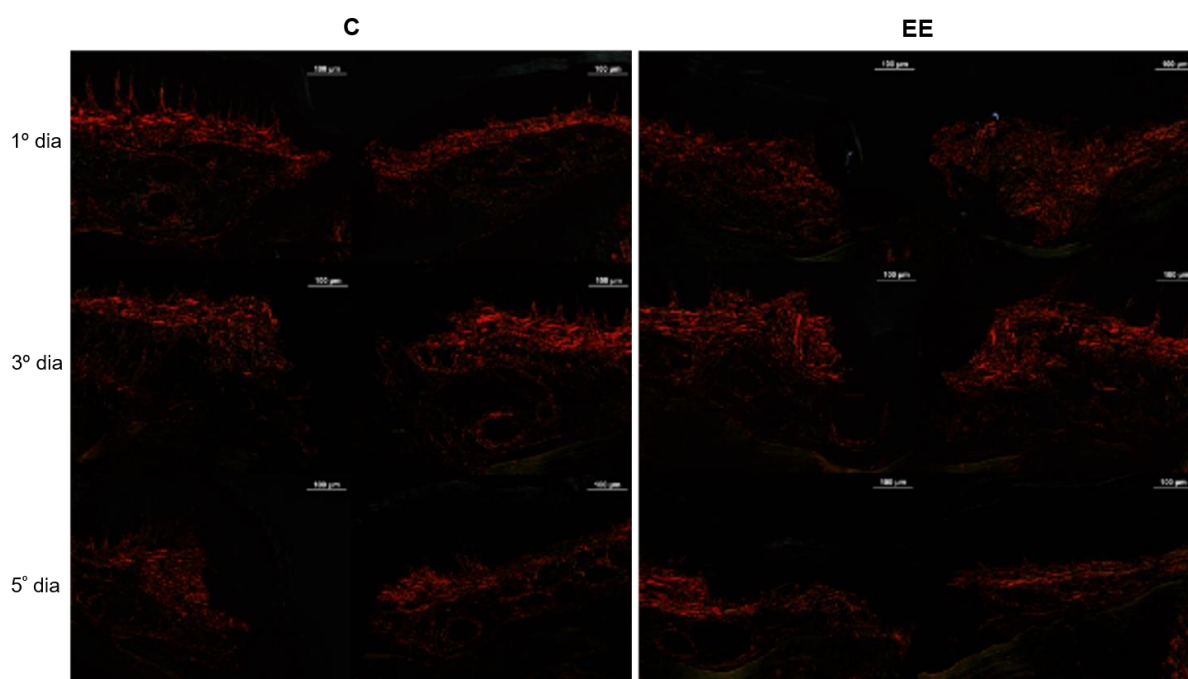
Tabela 1 - Média e desvio padrão da densidade de colágeno nas bordas do defeito

dias	C			EE		
	1º	3º	5º	1º	3º	5º
% de colágeno	10,8±5,9Aa	8,6±3,5Aa	7,5±2,9Aa	10,9±2,3Aa	9,22±2,4Aa	8,3±2Aa

Legenda: Letras maiúsculas distintas - diferença significativa ($p < 0,05$) na comparação intragrupo – ANOVA 2 fatores. Letras minúsculas distintas - diferença significativa ($p < 0,05$) na comparação intergrupo – ANOVA 2 fatores.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 12 - Fibras colágenas visualizadas por polarização



Legenda: Coloração Picrosirius Red visualizada por microscopia de polarização.

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.4 Avaliação dos fatores de crescimento e citocinas

De forma geral, o grupo EE apresentou valores numéricos menores do que o grupo C em relação a concentração dos marcadores inflamatórios, demonstrando que a inflamação foi menos intensa no grupo EE (Tabela 2).

Tabela 2 - Concentração (pg/ml) de citocinas e fatores de crescimentos

Grupos	Marcadores	Tempo		
		1º dia	3º dia	5º dia
	IL-1β			
C		381 $\pm$ 324Aa	1615 $\pm$ 1666ABa	3387 $\pm$ 2168Ba
EE		230 $\pm$ 166Aa	1663 $\pm$ 1152ABa	2318 $\pm$ 1754Ba
	IL-6			
C		13687 $\pm$ 5745Ab	3998 $\pm$ 2267Ba	2894 $\pm$ 1385Ba
EE		3957 $\pm$ 2018Aa	2176 $\pm$ 1049Aa	2931 $\pm$ 2034Aa
	IL-10			
C		49,7 $\pm$ 22Ab	31,6 $\pm$ 14Aa	44,8 $\pm$ 20Ab
EE		30,5 $\pm$ 19,7Aa	14,3 $\pm$ 7Aa	14,7 $\pm$ 4,5Aa
	TNF-α			
C		56,5 $\pm$ 14,7Ab	55,8 $\pm$ 15,4Ab	63,8 $\pm$ 28,8Ab
EE		28,1 $\pm$ 14Aa	35,1 $\pm$ 13,1Aa	24,9 $\pm$ 14,5Aa
	VEGF			
C		218,3 $\pm$ 91Aa	213,2 $\pm$ 108,3Aa	441,4 $\pm$ 276,5Bb
EE		108,2 $\pm$ 45,8Aa	113,5 $\pm$ 46,9Aa	200 $\pm$ 91,5Aa

Legenda: Letras maiúsculas distintas - diferença significativa ($p < 0,05$) na comparação intragrupo – ANOVA 2 fatores. Letras minúsculas distintas - diferença significativa ($p < 0,05$) na comparação intergrupo – ANOVA 2 fatores.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para a IL-1 β ambos os grupos apresentaram aumento da concentração do 1º para o 5º dia, porém sem diferença entre os grupos (Figura 13).

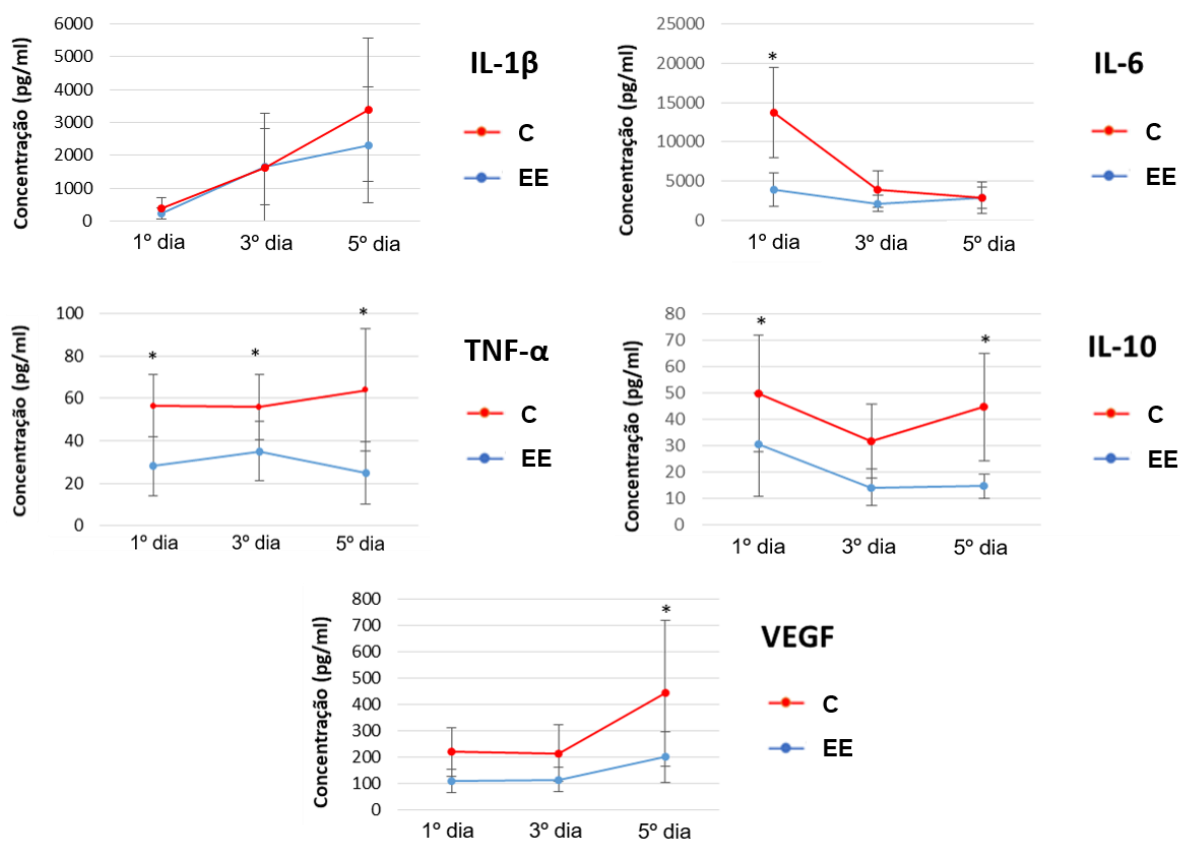
Em relação a IL-6, somente o grupo C apresentou redução ao longo do tempo avaliado, contudo o grupo EE no 1º dia apresentou concentração inferior comparado ao C ($p = 0,01$).

A IL-10 apresentou apenas diferença intergrupo no 1º ($p = 0,04$) e no 5º dia ($p = 0,007$), com o grupo C apresentando concentrações maiores que o grupo EE.

Para o $\text{TNF-}\alpha$, na comparação intergrupo, o grupo C apresentou concentrações maiores que EE em todos os tempos (1º dia, $p=0,01$; 3º dia, $p=0,04$; 5º dia, $p=0,002$).

Quanto ao VEGF, o grupo C no 5º dia ($p<0,05$) apresentou concentração maior em relação aos dias anteriores e ao grupo EE no mesmo dia avaliado ($p=0,01$).

Figura 13 - Perfil inflamatório e angiogênico



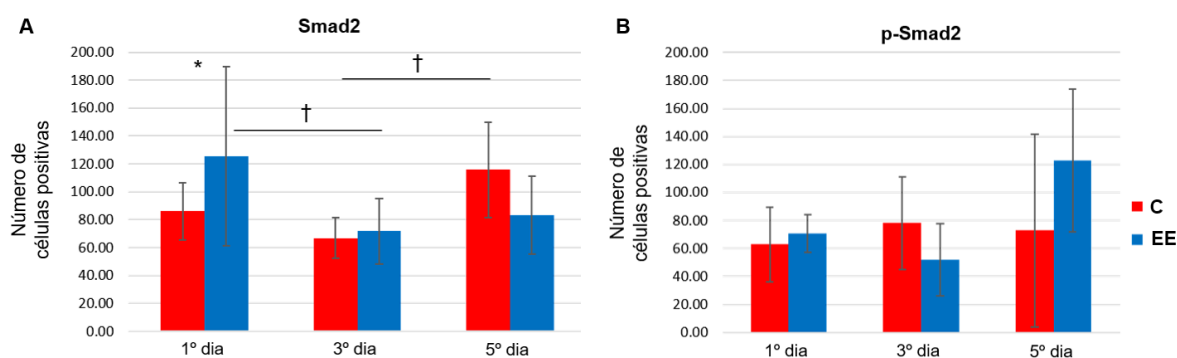
Legenda: Diferença significativa ($p<0,05$) na comparação intergrupo – ANOVA 2 fatores (*).

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.5 Avaliação das proteínas Smad's

O grupo C mostrou crescente imunomarcação positiva para as células Smad2, enquanto o inverso foi visto no grupo EE, tendo maior número de células positivamente marcadas no 1º dia. O grupo EE apresentou redução entre o 1º e o 3º dia enquanto o grupo C teve significativo aumento entre o 3º e 5º dia (Figura 14). Não houve diferença nas análises intragrupo e intergrupo em relação a p-Smad2 ($p>0,05$).

Figura 14 – Imunomarcação para Smad2 e p-Smad2



Legenda: Células positivas para Smad2 (A) e para p-Smad2 (B). Diferença significativa ($p<0,05$) na comparação intergrupo – ANOVA 2 fatores (*). Diferença significativa ($p<0,05$) na comparação intragrupo – ANOVA 2 fatores (†).

Fonte: Elaborada pelo autor.

5 DISCUSSÃO

Sabe-se que a lesão oral tem seu processo de fechamento mais rápido e com menos formação de cicatriz comparada com lesões dérmicas (Szpaderska et al., 2003; Szpaderska et al., 2005; Larjava et al., 2011) devido, em parte, pela resposta das células epiteliais orais no local da lesão (Chen et al., 2010). O fato do perfil inflamatório ter sido menos intenso na mucosa oral, contribuiu para a menor duração da fase inflamatória e melhor reparo, visto que a inflamação é um ponto crítico para a reconstrução tecidual e as fases seguintes (Chen et al., 2010). O estímulo elétrico atuou reduzindo as concentrações das citocinas e fatores de crescimento avaliados, com exceção da IL-1 β .

A persistência da reação inflamatória é um dos vários fatores que podem interferir no reparo da mucosa oral (Guo, DiPietro, 2010; Eming et al., 2007). Quando células epiteliais e fibroblastos orais foram expostos ao TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8, a migração celular foi afetada com aumento da apoptose nos fibroblastos orais. Além disso, essas células aumentaram a síntese de TNF- α , IL-1 β (Basso et al., 2016). Desde o início, notou-se que as concentrações de IL-6 e TNF- α permaneceram inferiores, o que contribuiu para a interrupção do feedback positivo inflamatório, ocasionado pelo excesso de síntese da TNF- α e IL-1 β , resultando no encurtamento deste processo comparado ao C. Ainda que a IL-1 β tenha aumentado ao longo do tempo, o TNF- α e a IL-6 permaneceram reduzidas favorecendo esse processo, suportado pelo resultado da DRC e DRE, de forma que as células encontraram um ambiente favorável para sua migração e proliferação levando ao resultado clínico do fechamento da lesão. Isto corrobora com a literatura que relata que a modulação da reação inflamatória é essencial para prover adequado reparo tecidual (Basso et al., 2016; Li et al., 2007; Guo, DiPietro, 2010; Eming et al., 2007).

A IL-10 é reconhecida por suprimir a resposta inflamatória, inibindo a síntese de IL-1 β , IL-6 e TNF- α . Após a incisão em lesões cutâneas, notou-se dois picos de elevação da IL-10 com normalização em 24 horas e novo pico em 72h (Sato et al., 1999). Na lesão oral, observou-se um padrão diferente, sendo que em 72 horas ambos os grupos apresentaram redução, com posterior aumento no 5º dia no grupo C. O segundo pico de produção de IL-10 pode ser devido ao infiltrado de células mononucleares e pode estar relacionado com a máxima infiltração de macrófagos na lesão que geralmente ocorre entre o 2º e 3º dia (Sato et al., 1999). Contudo, o grupo EE apresentou concentração inferior no 1º e 5º dia comparado ao C, provavelmente porque os níveis das citocinas pro-inflamatórias mantiveram-se reduzidas ao longo dos períodos avaliados, efeito provável do estímulo elétrico, atuando como mecanismo para a resolução do processo inflamatório.

Durante o processo de reparo, o VEGF é o mediador mais significativo para a angiogênese. Os capilares são desenvolvidos rapidamente dentro de 7 dias alcançando máxima vascularidade ao 5º dia (Szpaderska et al., 2005). A concentração de VEGF foi aumentada em ambos os grupos no mesmo período, contudo o EE teve menor concentração. Se por um lado o nível de angiogênese é preciso para um ótimo reparo, capilares com pobre perfusão estão relacionados com resultados inferiores (DiPietro, 2016), sugerindo que o estímulo elétrico pode favorecer o reparo com menos angiogênese e conseqüentemente, menor chance de formação de cicatriz.

Durante a fase proliferativa, o epitélio migra em direção ao centro da lesão ao mesmo tempo em que há a formação do tecido de granulação para preenchimento da área lesada (Sato et al., 1999). Sua formação envolve a proliferação de fibroblastos, deposição de colágeno que é importante em todas as fases do reparo (Velmar et al., 2009) e o desenvolvimento da neovascularização. Uma vez que esse tecido tenha sido formado no interior da

lesão, a fase de remodelamento começa a restaurar a integridade estrutural e funcional do tecido (Li et al., 2007).

Nessa fase de transição entre a fase inflamatória e proliferativa do reparo, houve redução da DRE e DRC em todos os tempos avaliados no grupo EE. Essa modificação deve-se possivelmente ao perfil do processo inflamatório observado entre os grupos ao longo do tempo, considerando-se que o tecido conjuntivo descontínuo atua como fonte primária para formação do coágulo/homeostase, através dos vasos sanguíneos presente neste, além de ser o ambiente no qual o processo inflamatório se desenvolve, seguido pelas fases de proliferação e remodelamento. Durante o processo inflamatório, a matriz extracelular sofre a ação de diversas collagenases que favorecem a migração das células que compõe o infiltrado inflamatório (neutrófilos, macrófagos, linfócitos) como também fibroblastos e queratinócitos (Uitto et al., 1998; Häkkinen et al., 2000; Singer, Clark, 1999).

Quanto as células epiteliais, a literatura relata que a proteína de transcrição Smad2 está relacionada com a inibição da reepitelização (Tomikawa et al., 2012; Shimoe et al., 2014). Observou-se que o grupo EE teve maior contagem de células positivas no 1º dia. Mas, ao avaliar sua forma fosforilada, isto é, a p-Smad2 nuclear, não houve diferença entre os grupos. Dessa forma, embora a Smad2 tenha aumentado inicialmente no EE, isso não influenciou a reepitelização e, conseqüentemente, não houve ação anti-proliferativa nas células epiteliais, como visto no resultado de DRE.

A literatura também relata o efeito do estímulo elétrico na produção de colágeno (Demir et al., 2004), contudo não notou-se diferença entre os grupos, muito provavelmente devido ao tempo avaliado que contempla o início do acúmulo de colágeno.

Os resultados de menor fechamento a lesão no grupo EE concordam com estudos prévios que avaliaram o efeito de diversos protocolos de EE no reparo

(Reger et al., 1999; Cheing et al., 2014; Demir et al., 2004). Assim, os resultados clínicos observados juntamente com as avaliações do processo inflamatório e histológico demonstraram o efeito positivo da estimulação elétrica atuando principalmente nas fases iniciais do processo de reparo da lesão.

Dessa forma, este trabalho apresenta suporte inicial para o desenvolvimento de novos estudos, tanto no reparo de lesões orais com enfoque na periodontia quanto com aplicabilidade em outras especialidades, pois clinicamente outros desafios podem estar comumente associados ao reparo, tais como os fatores sistêmicos (diabetes, idade) e ambientais (fumo, stress).

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.

Velnar 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