

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

LETÍCIA FREITAS DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO CLÍNICA E HISTOLÓGICA DO EFEITO CICATRICAL DA
POMADA COLAGENASE E DA POMADA COLAGENASE E CLORANFENICOL
EM MUCOSA DO PALATO DE RATOS *WISTAR***

Alfenas /MG
2018

LETÍCIA FREITAS DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO CLÍNICA E HISTOLÓGICA DO EFEITO CICATRICAL DA
POMADA COLAGENASE E DA POMADA COLAGENASE E CLORANFENICOL
MUCOSA DO PALATO DE RATOS *WISTAR***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas da Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL, *campus* Alfenas, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Ciências Odontológicas.
Área de concentração: Odontologia.
Orientador: Prof. Dr. Noé Vital Ribeiro Júnior.

Alfenas /MG
2018

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central – Campus Sede

O48a Oliveira Letícia Freitas de
Avaliação clínica e histológica do efeito cicatricial da pomada colagenase e da pomada colagenase e cloranfenicol mucosa do palato de ratos Wistar / Letícia Freitas de Oliveira --Alfenas/MG, 2018.
57 f.: il. --

Orientador: Noé Vital Ribeiro Júnior.
Dissertação (Mestrado em Ciências Odontológicas) - Universidade Federal de Alfenas, 2018
Bibliografia.

1. Retração Gengiva. 2. Cicatrização de Feridas. 3. Colagenase microbiana.
I. Ribeiro Júnior, Noé Vital. II. Título.

CDD-617.6



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG
Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700 - Alfenas/MG, CEP: 37130-001



LETÍCIA FREITAS DE OLIVEIRA

AVALIAÇÃO CLÍNICA E HISTOLÓGICA DO EFEITO CICATRICIAL DA POMADA COLAGENASE E DA POMADA COLAGENASE E CLORANFENICOL SOBRE MUCOSA DO PALATO DE RATOS Wistar

A Banca Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Odontologia.

Aprovada em: 15/03/2018

Prof. Dr. Noé Vital Ribeiro Júnior
Instituição: Universidade Federal de Alfenas
UNIFAL-MG

Assinatura:

Profª. Dra. Juliana dos Santos Neves
Instituição: Universidade Federal de Alfenas
UNIFAL-MG

Assinatura:

Profª. Dra. Wagner Costa Rossi Júnior
Instituição: Universidade Federal de Alfenas
UNIFAL-MG

Assinatura:

AGRADECIMENTOS

A Deus, que tornou tudo possível. Obrigada pela sua fidelidade, graça e misericórdia. Obrigada por esta vitória.

A meu orientador Prof. Dr. Nóe Vital Ribeiro Júnior, por todo conhecimento transmitido e pelas experiências profissionais vivenciadas. Obrigada pelo carinho e atenção no decorrer do mestrado e pela orientação na minha formação profissional.

A minha família por todo apoio e incentivo.

A Dr^a. Maria Paula Figueiredo Pereira Nascimento que me incentivou na investigação do tema e me ensinou muito na prática clínica.

Ao acadêmico Gustavo pela parceria e companheirismo diário nos procedimentos do biotério.

A Maria Clara e Ana Paula pela ajuda com os experimentos no biotério.

Aos funcionários do Biotério Central da UNIFAL – MG, por estarem sempre dispostos a ajudar.

A Prof^a. Dr^a. Juliana dos Santos Neves, por toda dedicação na interpretação das análises microscópicas.

Ao Prof. Dr. Denismar Alves Nogueira, pela realização das análises estatísticas dessa pesquisa. Obrigada pela disponibilidade em colaborar.

Ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas da UNIFAL – MG, agradeço pelas oportunidades oferecidas durante esses anos.

À banca examinadora, pelo aceite do convite, presença e contribuição para correção e finalização desta dissertação.

A Prof^a. Dr^a Maria Rita Rodrigues e a sua doutoranda Carla Miguel de Oliveira e Laboratório de Bioquímica da UNIFAL – MG, pelo auxílio e acolhimento, por ceder seus equipamentos e dependências para a realização deste trabalho.

A técnica do laboratório de bioquímica, Eliana Batista Rocha, que nos orientou para a realização da coleta de sangue no experimento.

Aos funcionários da biblioteca, pelo auxílio e atenção.

Aos funcionários da Pós-Graduação da UNIFAL – MG, pelo auxílio no decorrer do programa.

Muito obrigada!

*“Porque dEle e por meio dEle, e para Ele, são todas as cousas.
A Ele, pois, a glória eternamente. Amém.”*

(Romanos 11.36)

RESUMO

Os enxertos gengivais consistem em abordagens cirúrgicas de remoção de tecido em áreas doadoras e reposição em recessões gengivais. A mucosa palatina constitui a principal fonte doadora de tecido conjuntivo e epitélio, pelo fato de ser revestida por uma camada de queratina. A área de remoção do enxerto localiza-se anatomicamente entre a última rugosidade palatina e a área do forame palatino maior (do primeiro pré-molar ao segundo molar). Atualmente os enxertos gengivais têm sido amplamente utilizados para resolver problemas estéticos periodontais. O objetivo deste estudo é avaliar clinicamente e histologicamente a ação da pomada de colagenase e da pomada de colagenase e cloranfenicol no processo de reparação dos tecidos em uma ferida na mucosa oral do palato em ratos, e se este composto apresenta toxicidade sistêmica. Foi confeccionada uma ferida no palato do rato e realizada a aplicação dos respectivos materiais, vaselina no grupo I de controle negativo, o grupo II recebeu a aplicação da colagenase, o grupo III, aplicação da colagenase e cloranfenicol, e o grupo IV, cloranfenicol, todos com protocolo definido 1 vez ao dia, por 3 dias. Nos dias 1, 5, 7 e 10 após o tratamento, três animais de cada grupo foram eutanasiados. Realizando posteriormente a análise clínica e histológica do reparo tecidual na ferida. E avaliação da toxicidade sistêmica dos compostos. No estudo nota-se que os fármacos utilizados não interferiram negativamente no processo de reparação tecidual. Os resultados mostraram que não houve diferença estatística na mensuração do tamanho da ferida após tratamento e que os parâmetros bioquímicos se comportaram com valores estatisticamente equivalentes.

Palavras-chave: Retração Gengiva. Cicatrização de feridas. Colagenase microbiana.

ABSTRACT

Gingival grafts consist of surgical removal of tissues from donating areas and the replacement of them on gingival recessions. The palatine mucosa is the main donating source of conjunctive and epithelium tissue, due to it being coated by a keratin layer. The graft removal area is anatomically located between the last palatine roughness and the area of the foramen palatine major (from the first premolar to the second molar). Nowadays the gingival grafts have been widely used to solve periodontal esthetical problems. The objective of this study is the clinical and histological evaluation of the action of the collagenase, and collagenase and cloranfenicol creams in the process of repairing the tissues of a wound on the palate mucosa of mouses. A wound in the mouse's palate was done and the application of the respective materials was carried out, vaseline on the negative control Group I. Group II received an application of collagenase while Group III received collagenase and cloranfenicol and Group IV cloranfenicol, all of the applications were done once a day for 3 days. On the first, fifth, seventh and tenth day after the treatment, three animals from each group were euthanized. Posteriorly the clinical and histological analysis of the tissue repair on the wound was performed and the physiological parameters evaluation AST and ALT. The study shows that the drugs used didn't intervene negatively in the process of tissue repair. The results showed that there was not any statistic difference in the measures of the wound after treatment and that the biochemical parameters presented values statistically equivalent.

Keywords: Gingival Retraction. Wound healing. Micronian Collagenase.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAP –	Academia Americana de Periodontologia
ALT –	Alanina amino transferase
AST –	Aspartato amino transferase
CONCEA –	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
EGF –	Fator de crescimento epidérmico
FGF –	Fator de crescimento derivado dos fibroblastos
mm –	Milímetro
PDGF –	Fator de crescimento derivado das plaquetas
pH –	Potencial hidrogeniônico
TGF- β –	Fator de crescimento de transformação beta
μm –	Micrômetro

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Médias das áreas da ferida de todos animais	42
Tabela 2 – Relação entre as médias dos grupos de parâmetros AST e ALT	43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Desenho esquemático da conformação do epitélio estratificado pavimentoso, tecido conjuntivo e membrana basal.....	17
Figura 2 –	Classificação de Miller (1985) para recessão gengival	22
Figura 3 –	O sítio doador no palato: Área amarela e Área laranja – região doadora, p – palato, P2 – pré-molar, S – seio maxilar, seta indicando local que passa o feixe vaso-nervoso	24
Figura 4 –	Representação esquemática da especificidade celular correlacionada no tempo com as fases da cicatrização	30
Figura 5 –	1: A - Animal no momento da cirurgia. B - Modelo da ferida no palato do rato. Os asteriscos mostram os locais de infiltração anestésica. A linha a tracejado na figura corresponde à superfície de corte mostrada em C. C - Diagrama de secção transversal de histológico da ferida. (X, espaço do tecido de granulação; y, espaço do tecido epitelial). 2: Imobilização do animal para manutenção da boca aberta após anestesia geral.....	38
Figura 6 –	A - Realização do defeito na mucosa com um Punch de 4 mm de diâmetro. B - Tecido excisionado. C - Aplicação do composto na ferida com o microbrush	38
Figura 7 –	A - Utilização da trefina de 10 mm. B - Aspecto circular após penetração da trefina. C - Espécime removido	40
Figura 8 –	Achados clínicos após tratamento com vaselina, colagenase, colagenase e cloranfenicol e cloranfenicol. Cicatrização da ferida observada nos dias 1, 5, 7 e 10	42
Figura 9 –	Seta indicando o infiltrado inflamatório	44
Figura 10 –	Imagem microscópica - 5x tirada do microscópio óptico binocular (AxioLab A1 Plus-Carl Zeiss) imagens dos animais do grupo II com tempo de eutanásia de 10 dias	45
Figura 11 –	Amostra do Grupo II	46

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	Objetivos	13
1.1.1	Objetivos específicos.....	13
1.2	Justificativa	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	Mucosa Oral	15
2.2	Recessão gengival	19
2.2.1	Definição.....	19
2.2.2	Etiologia.....	20
2.2.3	Classificação.....	21
2.3	Enxertos	23
2.4	Cicatrização	26
2.4.1	Fase inflamatória.....	27
2.4.2	Fase proliferativa.....	28
2.4.3	Fase remodelagem.....	29
2.5	Ação da Colagenase e do cloranfenicol	31
2.6	Parâmetros fisiológicos	34
3	MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1	Comitê de ética	36
3.2	Animais	36
3.2.1	Grupos experimentais e tratamento	36
3.3	Procedimento cirúrgico e medição de ferida	37
3.4	Eutanásia	39
3.4.1	Obtenção do espécime.....	39
3.5	Análise histológica	40
3.6	Análise estatística	40
4	RESULTADOS	41

4.1	Aspecto clínico das feridas.....	41
4.2	Área da ferida.....	41
4.3	Toxicidade sistêmica.....	42
4.4	Análises microscópicas descritivas.....	43
5	DISCUSSÃO.....	47
6	CONCLUSÃO.....	49
	REFERÊNCIAS.....	50
	ANEXO	56

1 INTRODUÇÃO

Na última década, cresceu muito a procura pela odontologia estética. A cirurgia plástica periodontal e os procedimentos para abordar estas áreas estéticas aumentaram consideravelmente a demanda e tornaram-se parte integrante no tratamento periodontal. Várias modalidades terapêuticas como os enxertos gengivais livres, enxertos pediculados, enxertos de tecido conjuntivo, enxertos combinando as duas modalidades e regeneração tecidual guiada têm sido usadas para cobrir as raízes descobertas e para conquistar a largura e espessura da gengiva queratinizada (PANDIT et al., 2016). Os procedimentos de enxertia resultam na redução ou eliminação de hipersensibilidade da raiz, melhoram a estética e facilitam o controle da placa bacteriana (MICHAELIDES; WILSON, 1994; RICCI et al., 1996).

A recessão gengival está entre os problemas periodontais mais comuns no adulto jovem (MATAS; SENTIS; MENDIETA, 2011 *apud* RANJBARI et al., 2016). O melhor e mais citado método de tratamento da recessão gengival envolve enxerto do tecido conjuntivo removido da mucosa do palato duro (BEDNARZ et al., 2016).

O processo de cicatrização da mucosa oral requer múltiplos passos, tais como angiogênese, migração dos fibroblastos e reepitelização. A diminuição da capacidade de cicatrização de uma ferida na mucosa oral envolve geralmente um atraso no processo de regeneração de tecidos (ODA; KAGAMI; UEDA, 2004).

A mucosa oral tem inúmeras vantagens quanto à absorção de fármacos, incluindo uma elevada taxa de permeabilidade e um elevado fluxo sanguíneo (PATEL; LIU; BROWN, 2012). A administração tópica de drogas na mucosa oral tem várias vantagens sobre a administração via oral, incluindo a prevenção de seu metabolismo no trato gastrointestinal e seus efeitos hepáticos (SHINKAR; DHAKE; SETTY, 2012). Corticosteroides tópicos são prescritos comumente para o tratamento de sintomatologia de úlceras traumáticas em boca (CAMPISI et al., 2007). O acetato de triancinolona, um glicocorticoide sintético de ação prolongada, tem sido utilizado para o tratamento de doenças inflamatórias orais (SHIN; KIM, 2000).

O clostridial collagenase promove respostas celulares à lesão *in vivo*, resultando em redução do tecido de granulação, aumentando as taxas de reepitelização e reduzindo o intervalo para fechamento da ferida (RILEY; HERMAN, 2005).

A pomada collagenase e cloranfenicol tem sido muito utilizada como um medicamento efetivo no tratamento de feridas na pele. A associação de collagenase com cloranfenicol é

utilizada como agente debridante em lesões superficiais, promovendo a limpeza enzimática das áreas lesadas, retirando ou dissolvendo, enzimaticamente, tecidos necrosados e crostas (SILVA et al., 2010).

E é justamente tal possibilidade de tratamento de feridas que apresentam tecidos desvitalizados e necróticos, ao atuar enzimaticamente no colágeno aderido no leito da ferida, que o uso da pomada com princípio ativo colagenase e cloranfenicol motivou a presente investigação, no que se refere a verificar sua interferência no processo de reparo tecidual da área doadora em mucosa oral em cirurgias de enxertos.

1.1 Objetivos

Avaliar clínica e histologicamente a ação dos compostos colagenase e cloranfenicol no processo de reparação dos tecidos colaborando para a elucidação do referido tema.

1.1.1 Objetivos específicos

- a) Avaliar clinicamente a cicatrização da ferida por meio de avaliação visual e da medida de sua área nos períodos 1, 5, 7 e 10 dias o tecido de reparo;
- b) Avaliar os aspectos histológicos da cicatrização em cortes corados em H-E a formação de fibras colágenas, a presença de células inflamatórias, tecido de granulação, neoformação vascular e de neoformação epitelial;
- c) Apresentar um método para acelerar a cicatrização da ferida na área doadora para enxertos gengivais e proporcionar um pós-operatório com menor morbidade aos pacientes.

1.2 Justificativa

Os enxertos removidos da mucosa oral no palato duro dos pacientes deixam o periosteó exposto, pois é removida a parte epitelial e também parte do tecido conjuntivo. Como consequência, a região fica cruenta e pacientes relatam muito desconforto e dor na região da ferida realizada. A área doadora cicatriza por segunda intenção, sendo a sua cicatrização lenta e necessitando de alguma forma acelerar o processo de reparo tecidual.

É utilizada, em muitas das vezes, uma moldeira confeccionada de um material plástico para impedir a compressão dos alimentos com a superfície cruenta e amenizar a dor; porém, esta moldeira exerce certa pressão na região dificultando sua cicatrização.

Deste modo, faz-se necessário diminuir o tempo de exposição da região cruenta e buscar novos métodos para acelerar o reparo da ferida, garantindo um pós-operatório mais confortável e satisfatório para os pacientes submetidos a cirurgias de enxertias teciduais.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Mucosa oral

A cavidade da boca ou cavidade oral é a parte inicial do sistema digestório. Está localizada no terço inferior da face e mantém comunicação com o exterior pela abertura oral e com a parte oral da faringe (orofaringe) através de uma abertura ampla denominada istmo da garganta (das fauces). Totalmente fechada, a cavidade oral apresenta divisão pelos arcos dentais, o que se dá em duas porções: uma anterior anterolateral, menor, chamada de vestibulo da boca, e a outra posterior e maior, sendo a cavidade própria da boca, com forma ovalada. Com os dentes em oclusão, estas duas partes comunicam-se pelo espaço entre os últimos molares e a borda anterior do ramo da mandíbula (RIZOLLO; MADEIRA, 2010).

A gengiva engloba uma porção livre que normalmente delimita o sulco gengival e uma porção aderida que se estende desde a gengiva livre até à linha mucogengival, separando a gengiva aderida da mucosa alveolar de revestimento. Os limites externos da gengiva se estendem desde a margem gengival da papila interdentária até à junção mucogengival. A junção mucogengival pode ser localizada funcionalmente, através dos movimentos passivos dos lábios e bochechas; anatomicamente, por causa das diferenças de cor e de textura das superfícies, e histoquimicamente, através de solução iodada de Schiller, que pesquisa o glicogênio armazenado no epitélio da mucosa (ALVES, 2011).

A altura máxima da gengiva aderida (em média) na maxila é de cerca de 4 a 6 mm, valores estes encontrados na região vestibular dos incisivos maxilares e lingualmente nos molares mandibulares. No geral, a altura da gengiva aderida em jovens e em adultos jovens está relacionada com o crescimento do processo alveolar e com a posição dos dentes relativamente à espessura do processo alveolar. Quando os dentes anteriores estão situados labialmente, a altura da gengiva diminui, aumentando quando os dentes estão localizados lingualmente. A espessura da gengiva vestibular varia entre 0,5mm nos biótipos gengivais finos e 2,5mm nos biótipos gengivais espessos, cabendo ressaltar que tais valores são normalmente inversamente proporcionais à altura da gengiva (ALVES, 2011).

A função da gengiva é essencialmente de proteção do conjunto dento-alveolar, sendo de extrema importantíssima para assegurar condições de saúde periodontal (ALVES, 2011).

Há que se mencionar também, enquanto componentes da cavidade oral, os lábios, encontrados na parede anterior e formados por pregas musculares membranosas constituídas pelos músculos orbiculares labiais que, por sua vez, formam o contorno do orifício bucal e as

bochechas, nas paredes laterais, constituídas por músculos da mímica e mastigadores. Como nas demais formações limitantes, os lábios apresentam-se estratificados, com várias camadas, entre as quais se encontram vasos e nervos. São cinco as suas camadas, sendo que, de fora para dentro, têm-se a camada cutânea, apresentando glândulas sudoríferas e sebáceas; a tela subcutânea; a camada muscular; a camada submucosa com glândulas salivares e vasos sanguíneos e a camada mucosa. Quando os lábios estão em contato, delimitam a rima da boca, cujas extremidades constituem os ângulos da boca (comissura labial). Normalmente, o lábio superior apresenta menor mobilidade do que o inferior (RIZOLLO; MADEIRA, 2010).

No tocante à bochecha, esta forma a parede lateral da cavidade da boca, apresentando as mesmas camadas encontradas nos lábios. Em sua camada subcutânea são observados vários elementos anatômicos, tais como o músculo bucinador, o corpo adiposo da bochecha, o ducto parotídeo e alguns músculos da expressão facial (mímicos). Seu limite externo é extenso e não muito preciso, com ressalta de que, internamente, este limite é menor e está delimitado em sua porção superior e inferior pelo fórnice do vestíbulo e posteriormente pela prega pterigomandibular, formada pelo ligamento pterigomandibular recoberto por mucosa, mostrando-se bastante visível quando se abre amplamente a boca. Internamente, na altura do segundo molar superior, abre-se o ducto parotídeo que é protegido por uma saliência, normalmente de forma triangular, a papila parotídea (RIZOLLO; MADEIRA, 2010).

A mucosa do palato duro é formada por epitélio estratificado pavimentoso queratinizado e tecido conjuntivo fibroso (rico em fibras colágenas) não modelado rico em glândulas mucosas, que continua com o perióstio do tecido ósseo. Sua constituição permite que o alimento seja pressionado contra o palato duro durante a deglutição (BERKOVITZ; HOLLAND; MOXHAN, 2004). Constituinte do palato duro, a camada córnea tem como função proteger a mucosa oral no ato mastigatório (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

No palato mole, contínuo ao palato duro, em vez de osso, a mucosa está apoiada em camadas de tecido muscular estriado esquelético e tecido conjuntivo fibroso, que têm a função de impedir a passagem do ar no momento da deglutição. É formado por mucosa do tipo revestimento (BERKOVITZ; HOLLAND; MOXHAN, 2004).

Na cavidade oral, tem-se a mucosa bucal que, por sua vez, é formada por duas camadas de tecido de origens embriológicas distintas: o epitélio e a lâmina própria. O epitélio apresenta-se de dois tipos: não-queratinizado, para-queratinizado ou queratinizado e é classificado como estratificado pavimentoso. O tecido conjuntivo que forma a lâmina própria é composto por fibras colágenas, fibroblastos, células de defesa, vasos sanguíneos e nervos. Os dois tipos de tecidos interagem por meio das papilas conjuntivas da lâmina própria e as

cristas epiteliais que se formam no epitélio sobrejacente (BERKOVITZ; HOLLAND; MOXHAN, 2004).

O tecido epitelial reveste as cavidades do corpo humano. O epitélio tem como principal característica a justaposição das células, com várias faces, muito citoplasma, citoesqueleto desenvolvido e polaridade e pouca matriz extracelular. Esta abundância de citoplasma está relacionada com a intensa atividade bioquímica, sendo que tais células realizam vários processos metabólicos como síntese e secreção (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

O revestimento é uma das funções primordiais do epitélio, cobrindo a superfície do corpo, exercendo a função de proteção, tanto dos tratos digestório, respiratório e urogenital, como das cavidades corporais e os vasos sanguíneos e linfáticos. O tecido epitelial realiza ainda absorção, como nos intestinos, excreção, como nos túbulos renais, e secreção, como nas glândulas. Já os tipos especiais de epitélio desempenham função sensorial, como o dos órgãos sensoriais, e função germinativa, como o epitélio dos testículos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Desta maneira, o epitélio pavimentoso estratificado, queratinizado ou não queratinizado faz o revestimento da cavidade oral (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Conforme mostra a Figura 1.

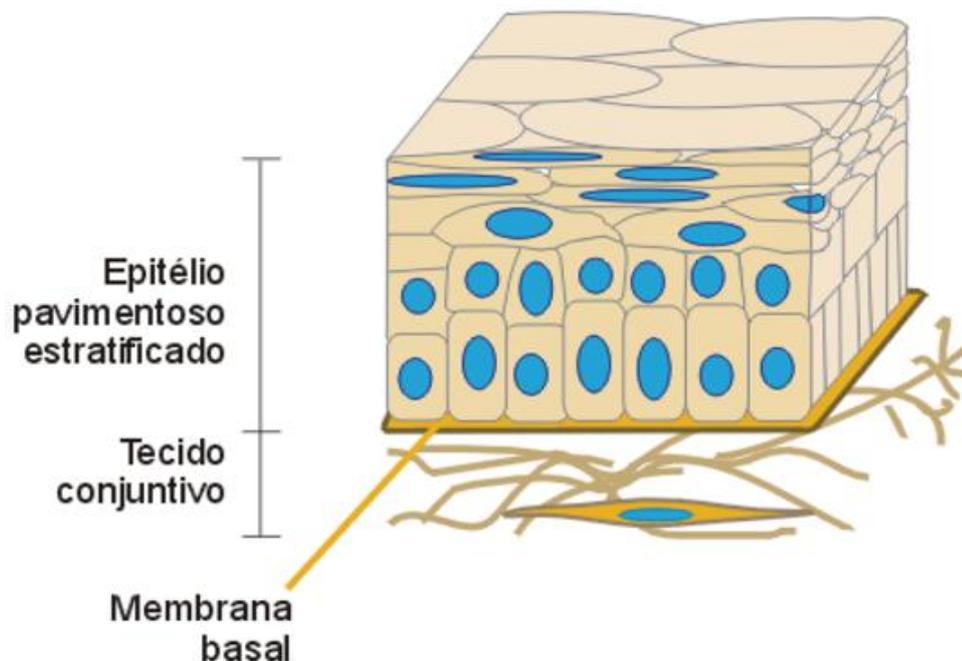


Figura 1 – Desenho esquemático da conformação do epitélio estratificado pavimentoso, tecido conjuntivo e membrana basal.

Fonte: Abrahamssohn (2017).

A mucosa da cavidade bucal é dividida em mastigatória (cujo epitélio que reveste o palato duro é do tipo queratinizado e está sobreposto a uma lâmina própria rica em tecido conjuntivo fibroso), de revestimento (com uma fina camada de tecido epitelial recobrimo uma lâmina própria bastante vascularizada e menos fibrosa quando comparada à lâmina própria da mucosa mastigatória) e especializada (recoberta por epitélio queratinizado e não queratinizado), e tal divisão se dá devido segundo o tipo de epitélio que reveste o tecido conjuntivo subjacente. Desta maneira, nas regiões nas quais são maiores os impactos sofridos pela mastigação, a mucosa deve ser mais firme e resistente e, portanto, recoberta por um epitélio que pode variar entre o paraqueratinizado e o queratinizado. Já nas áreas nas quais a demanda mastigatória não é tão grande, o epitélio de revestimento é normalmente bastante fino e composto por células não queratinizadas. A região lingual é distinta das demais áreas da cavidade bucal por apresentar uma grande quantidade de botões gustativos, e é por isso que a região do dorso da língua é classificada como mucosa especializada (BERKOVITZ; HOLLAND; MOXHAN, 2004; RIZOLLO; MADEIRA, 2010).

Ainda no que se refere ao tecido epitelial, tem destaque o tecido epitelial estratificado pavimentoso, que é abundantemente encontrado, sendo organizado em camadas que variam de acordo com a localização das células. As células mais próximas à membrana basal costumam ser cúbicas ou cilíndricas enquanto que as células mais próximas ao lúmen são achatadas. Na superfície deste tipo de tecido há uma grande taxa de descamação o que, por sua vez, leva a uma grande renovação celular, período no qual as células migram da parte mais basal para a região apical, sofrendo alterações na forma e na função (KIERSZENBAUM, 2012).

Esse tipo de tecido é encontrado em regiões onde há atrito e forças mecânicas, tal como na boca, sendo comumente chamado de epitélio estratificado pavimentoso não queratinizado. Na pele, o epitélio é chamado de pavimentoso estratificado queratinizado, pois durante a migração das células das camadas mais basais para a camada mais apical, elas perdem as suas organelas e seu citoplasma é preenchido por queratina, o que acaba por impedir a perda de líquido pela pele (KIERSZENBAUM, 2012).

Daí sua importância na reparação tecidual, seja na cicatrização ou regeneração.

2.2 Recessão gengival

2.2.1 Definição

Segundo a Academia Americana de Periodontologia (AAP), a recessão gengival é definida como a migração apical da margem gengival em relação à junção amelocementária (PAREDES et al., 2008).

A recessão gengival é definida como a mudança da gengiva marginal para uma posição mais apical na direção da junção cimento-esmalte e acarretando a exposição da superfície radicular ao meio bucal (KO; LU, 2010). Pode ocorrer em áreas isoladas ou múltiplas na cavidade bucal, com diferentes graus de extensão (DANTAS; SILVA; SAKO, 2012). A recessão gengival equivale à perda de inserção da gengiva marginal livre, e resulta em uma posição mais inferior da mesma, permitindo que a raiz do elemento dental se apresenta exposta. A recessão pode englobar ambos os arcos, nas faces vestibulares e linguais e em quaisquer dentes. Sua etiologia é multifatorial, conforme apresentado adiante, e sua classificação está relacionada com a severidade da perda (YARED; ZENOBIO; PACHECO 2006).

A recessão gengival é um dos problemas periodontais mais comuns em adultos jovens e pode ocorrer em pacientes com higiene bucal falha ou escassa. Existe uma clara relação entre recessão gengival e vários fatores de risco, como placa dentária, cálculo, consumo de tabaco, frequência de escovação dentária, trauma de escovação, trauma oclusal e mal posicionamento dos dentes (REINO et al., 2012).

Dentre as complicações da recessão gengival podem ser citadas a perda de sensibilidade do dente, problemas estéticos, impacto negativo na alimentação, acumulação de placas que conduzem a cáries radiculares, falta de gengiva anexada, polpa hiperêmica, problemas endodônticos, dificuldades de restauração e perda dentária (ROMAN et al., 2010).

A principal queixa do paciente que apresenta recessão gengival é a estética, sendo observado um aspecto alongado do elemento dental exposto a tal patologia, o que leva à falta de harmonia do sorriso. Ademais, a hipersensibilidade dentinária, caracterizada por estímulos térmicos (quente ou frio), táteis (escovação) e osmóticos (doce) também é uma queixa frequente dentre os pacientes que sofrem com tal perda (SANTAMARIA, 2010).

Justamente por isso, a questão da recessão gengival tem lugar na abordagem da reparação tecidual, uma vez que a identificação precoce e o correto diagnóstico desta

alteração gengival favorecem um tratamento eficaz e um prognóstico satisfatório, principalmente no tocante à estética (LINDHE, KARRING, LANG, 2005).

2.2.2 Etiologia

A recessão gengival representa uma condição clínica de perda de inserção do periodonto sendo observada como uma enfermidade de alta prevalência e sua etiologia não é fácil de ser determinada, uma vez que vários fatores estão associados, exercendo funções mais ou menos significativas, ou seja, fatores que atuam apenas tornando o hospedeiro mais suscetível, como também aqueles responsáveis diretos pelo desencadeamento da doença (BORGHETTI; MONNET-CORTI, 2002).

A recessão tecidual marginal é uma característica comum em populações com altos padrões de higiene oral, bem como em populações com higiene oral precária. O trauma ao tecido provocado pela escovação vigorosa é considerado um fator causal dominante para o desenvolvimento das retrações, particularmente em indivíduos jovens (LINDHE, KARRING, LANG, 2005).

Esta tem como fatores de risco a placa dental, cálculo, o fumo, frequência de escovação dentária, escovação traumática, freio hipertrófico, trauma oclusal e mau posicionamento de dentes (REINO et al., 2012). Também as restaurações subgengivais podem facilitar o acúmulo de placa e a gengiva adjacente delgada, pode aumentar o risco para o desenvolvimento da retração marginal (LINDHE; KARRING; LANG, 2005).

Pode estar associada a outros fatores etiológicos como ausência de gengiva inserida ou uma fina camada da mesma, bem como a posição dos dentes proeminentes no arco (OTTONI; MAGALHÃES, 2006). A prevalência, extensão e gravidade das recessões gengivais apresentam consideráveis diferenças entre cada estudo das populações estudadas (MARINI et al., 2004).

Estudos demonstraram que mais de 50% da população apresentam um ou mais locais de recessão gengival de 1 mm ou mais (AFONSO; GUIMARÃES, 2012).

Dentre os fatores etiológicos da recessão gengival, podem ser citados os fatores anatômicos, fator fisiológico, fatores patológicos, traumas e higiene. Dentre os fatores anatômicos, têm-se a fenestração, posição anormal do dente no arco, trajeto da erupção do dente e deiscência óssea, o que leva o osso a ficar anatomicamente mais fino, propiciando sua reabsorção. O fator fisiológico parte do princípio de uma placa mais fina de osso levando à deiscência óssea, e esta deiscência pode ser causada por movimentação ortodôntica. Os

fatores patológicos incluem as sequelas de uma doença periodontal, fazendo com que o osso sofra uma reabsorção microbiana (KASSAB; COHEN, 2003).

Dentre os traumas que ocasionam a recessão gengival, pode-se destacar a escovação traumática, traumas oclusais, tabaco, procedimentos operatórios (instalação de matrizes, restaurações mal adaptadas, desenho inadequado de uma prótese parcial removível, *piercing* no freio labial, dentre outros). O fator higiene pode ser citado como fator etiológico levando em consideração tanto o seu excesso (causando trauma), quanto a sua ausência o que, por sua vez, levaria ao acúmulo de placa dental (KASSAB; COHEN, 2003).

De maneira geral, estudos demonstraram que mais de 50% da população apresenta um ou mais locais de recessão gengival de 1 mm ou mais (RANJBARI et al., 2016).

Como agentes predisponentes secundários têm destaque o posicionamento incorreto dos dentes, deiscência óssea, movimentação ortodôntica, disfunção oclusal, fatores iatrogênicos, inserção muscular atípica e pequena quantidade de gengiva queratinizada (ARAÚJO et al., 2007).

2.2.3 Classificação

Miller (1985) propôs uma classificação considerando a recessão tecidual marginal associada à periodontite, portanto, considerando todas as formas de recessões, baseando-se em medidas entre a margem gengival, a junção mucogengival e a perda óssea interdentária. Esta classificação tem um objetivo terapêutico e se refere à classificação utilizada atualmente. Sendo assim classificadas:

Classe I – recessão do tecido marginal que não se estende até a junção mucogengival. Não há perda de osso ou de tecido mole interdentais. Previsão de 100% de cobertura radicular;

Classe II – recessão do tecido marginal se estende até ou além da junção mucogengival. Não há perda de osso ou tecido mole interdentais. Previsão de 100% de cobertura radicular;

Classe III – recessão do tecido marginal se estende até ou além da junção mucogengival. A perda de osso ou tecido mole interdentais é apical em relação à junção cimento-esmalte, porém coronária à extensão apical da retração do tecido marginal. Previsão de cobertura radicular parcial;

Classe IV – recessão marginal se estendendo além da junção mucogengival. A perda do osso interdental se estende até um nível apical em relação à extensão da retração do tecido marginal. Não há previsão de cobertura radicular pelos métodos cirúrgicos convencionais

A Figura 2 traz a classificação de Miller (1985) para a recessão gengival.

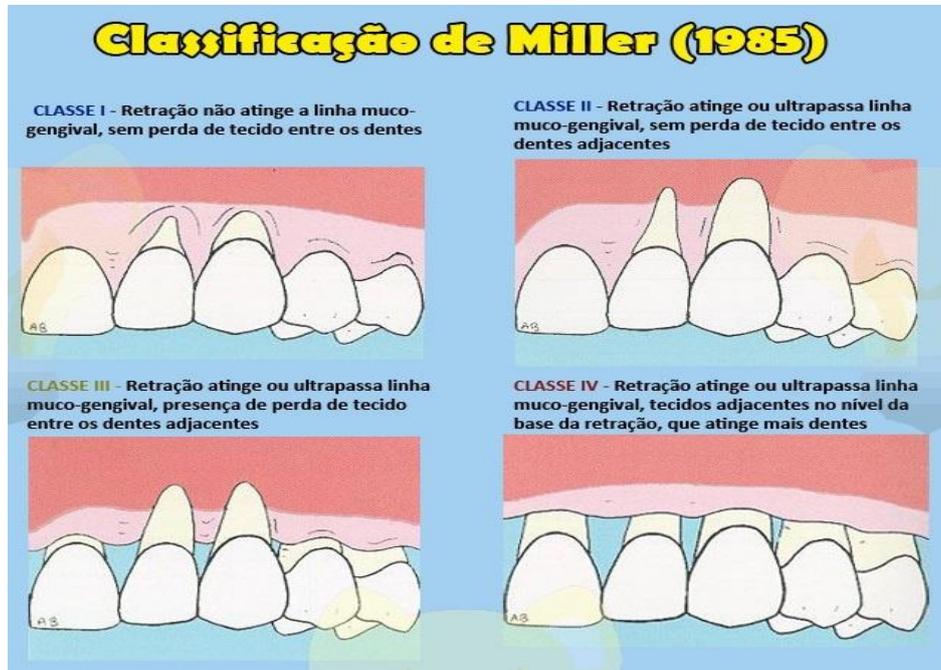


Figura 2 – Classificação de Miller (1985) para recessão gengival.
Fonte: Adaptado de Miller (1985).

O maior benefício da classificação de Miller (1985) é correlacionar o prognóstico do tratamento (recobrimento radicular) à integridade ou não do osso interproximal. Assim, nas lesões Classe I e II, em que o osso interproximal está intacto, antecipa-se a possibilidade de recobrimento integral das superfícies radiculares, ao passo que nas lesões Classe III, a expectativa de recobrimento é parcial, considerando o máximo de recobrimento previsível até a altura óssea interproximal e nas lesões Classe IV, o prognóstico é totalmente desfavorável.

É possível classificar, ainda, a severidade das recessões gengivais com base na metodologia empregada por Marini et al. (2004). De acordo com a dimensão vertical da superfície radicular exposta, os autores caracterizam a recessão gengival como:

Leve – quando menos de 3 mm de superfície radicular estava exposta;

Moderada – quando 3 mm a 4 mm de superfície radicular estiver exposta;

Avançada – quando mais de 4 mm de superfície radicular estiver exposta.

Diante da classificação e dos problemas clínicos associados com a recessão periodontal, a importância do conhecimento sobre fatores relacionados a sua etiologia são relevantes no que se refere ao diagnóstico, planejamento e execução de qualquer tratamento

odontológico, com destaque para aqueles voltados para o reparo tecidual feito com enxertos enquanto foco do presente estudo.

2.3 Enxertos

Segundo vem sendo apresentado, na Odontologia estética e, mais precisamente, na periodontia, a recessão gengival é um dos problemas mais recorrentes.

Nesse contexto, a periodontia conta com grandes progressos nas técnicas cirúrgicas plásticas, com finalidade estética, sendo que, para o tratamento da recessão gengival, e tendo como grande norteador a classificação de Miller (1985), a técnica do enxerto tem lugar, tanto no que se refere à maior praticidade, redução de riscos, facilidade de local de doação de material para o enxerto e facilidade de recuperação do paciente (ARAÚJO et al., 2007; BEDNARZ et al., 2016).

As principais indicações para os procedimentos mucogengivais de proteção radicular são fatores estéticos/cosméticos, o desconforto e hipersensibilidade da raiz, tratamento de lesões cariosas rasas na raiz, abrasões cervicais e alteração da topografia do tecido marginal (LINDHE, KARRING, LANG, 2005).

No tratamento dos muitos tipos de recessão gengival são utilizados diferentes procedimentos cirúrgicos que, por sua vez, estão sujeitos a muitos fatores, tais como o tamanho do defeito, a presença ou ausência de gengiva queratinizada, o tecido adjacente ao defeito, e espessura da gengiva, que dependem do defeito e/ou do paciente (Uraz et al., 2015). Muitas técnicas têm sido propostas, como a do enxerto gengival livre, retalho posicionado lateral, retalho posicionado coronal e enxerto de papila dupla (DANTAS; SILVA; SAKO, 2012).

Dentre as técnicas cirúrgicas de enxerto voltadas para a recessão gengival têm-se a técnica livre, indicada para o aumento da altura e da espessura de tecido queratinizado ao redor de dentes e implantes, após eliminação da inserção de freios (Feitosa et al., 2008). Tal técnica também é utilizada em casos de recobrimento radicular auxiliando no tratamento de recessões gengivais para defeitos classe I e II de Miller, tanto no aspecto estético como na promoção da saúde, uma vez que o restabelecimento gengival diminui a incidência de dores causadas pela sensibilidade da raiz exposta (MONNET-CORTI; BORGHETTI, 2002).

A técnica de enxerto gengival livre é parecida com a técnica de enxerto de tecido conjuntivo subepitelial, descrita inicialmente por Langer, Langer (1985) compreendendo o uso de um enxerto de tecido conjuntivo combinado com retalho pediculado de espessura

parcial, reposicionado coronalmente. O aplainamento radicular com curetas ou pontas diamantadas era realizado para diminuir a convexidade radicular (FERRÃO JÚNIOR et al., 2003). As indicações para a técnica de enxerto de tecido conjuntivo subepitelial envolvem a impossibilidade clínica de um deslocamento lateral do retalho, retrações gengivais isoladas e largas, retrações múltiplas, abrasão radicular pequena, sensibilidade dentinária e comprometimento estético. Como contraindicações, podem ser citadas as áreas doadoras de pouca espessura, má higiene bucal e não colaboração do paciente ao tratamento, além de recessões classe IV de Miller (SAADE, BASSANI, 2002).

Ambas as técnicas, apesar de eficazes, utilizam duas áreas cirúrgicas, aumentando os riscos e inconvenientes pós-operatórios.

O melhor e mais documentado método de cobertura de recessão gengival envolve o enxerto de tecido autógeno removido do palato duro e retalhos pediculados (ESPINOSA; SOSNIK; FONTANILLA, 2010).

O palato duro é o sítio doador regular para enxertos de tecidos moles, sendo considerado padrão ouro; as principais limitações da remoção do tecido do palato duro são a espessura da mucosa e a localização do feixe vâsculo-nervoso palatino, conforme Figura 3 (BERTL et al., 2015).

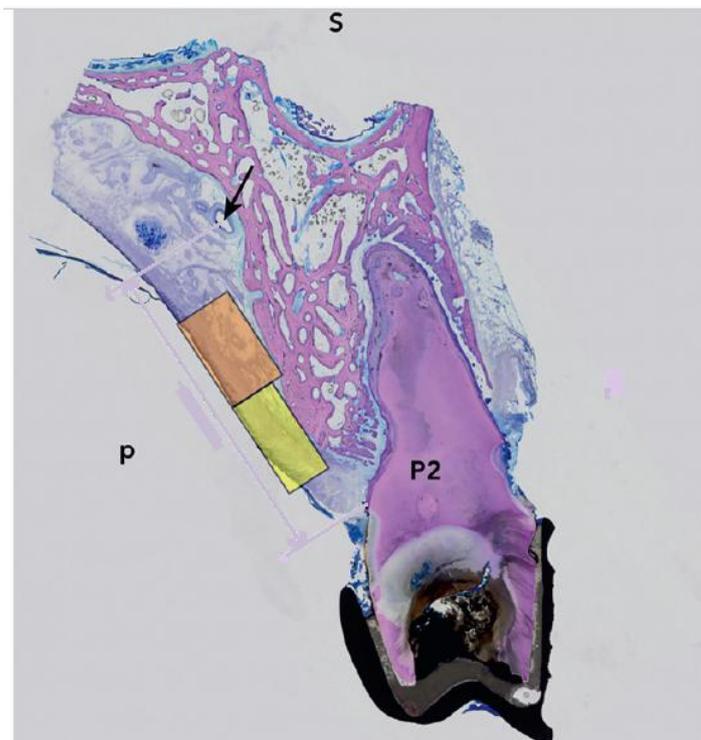


Figura 3 – O sítio doador no palato: Área amarela e Área laranja – região doadora, p – palato, P2 – pré-molar, S – seio maxilar, seta indicando local que passa o feixe vâsculo-nervoso.
Fonte: Adaptado de Bertl et al. (2015).

O enxerto de palato duro pode ser colhido sob anestesia local ou geral. A área doadora é demarcada anteriormente pelas pregas palatinas, posteriormente 3 mm anterior ao palato mole, lateralmente pela gengiva e medialmente pela linha mediana do palato duro. A espessura total do enxerto é de aproximadamente 2 mm, devendo-se evitar o aprofundamento da incisão para não lesar o periósteo e os vasos sanguíneos maiores. Considera-se que a integridade do periósteo seja um fator importante na cicatrização da ferida (MONNET-CORTI; BORGHETTI, 2002).

Quando da remoção do enxerto, deve-se estar atento à vascularização e à inervação destas áreas doadoras. Isso porque o suprimento arterial do palato provém da artéria palatina maior, ou seja, um ramo da artéria maxilar que emerge do forame palatino maior, sendo que esta artéria corre em direção anterior lateralmente ao nervo palatino maior, emitindo ramificações para a mucosa palatina e gengiva, diminuindo progressivamente seu diâmetro, e sofre anastomose com a artéria esfenopalatina. Portanto, com relação aos riscos de complicações, o feixe vâsculo-nervoso palatino é uma estrutura anatômica relevante que merece ser preservada (VENTURIM; JOLY; VENTURIM, 2011).

Algumas vantagens da utilização do tecido autógeno removido do palato duro envolvem justamente o fato deste ser um tecido de obtenção relativamente fácil, apresentar uma superfície mucosa composta de epitélio escamoso estratificado com queratinização variável e que, posteriormente, se torna não-queratinizado, além de apresentar um suporte estrutural com retração mínima (MONNET-CORTI; BORGHETTI, 2002).

O tratamento para as recessões gengivais envolve eliminação dos fatores de risco, ressaltando a importância de uma boa higiene bucal, para assim realizar a cobertura cirúrgica de recessões e mantê-la (BEDNARZ et al., 2016).

A escolha da técnica cirúrgica mais apropriada para o caso é fundamental, pois a porcentagem de sucesso pode diminuir com o aumento da profundidade e largura das recessões gengivais. Ademais, devem ser levados em conta outros fatores considerados determinantes para o sucesso do enxerto, tais como a análise criteriosa da classificação de Miller, a descontaminação e biomodificação da superfície radicular exposta e a redução da convexidade radicular para permitir íntima adaptação do enxerto ao leito receptor. O sucesso integral do recobrimento radicular considera o posicionamento da margem gengival na altura da junção cimento-esmalte, presença de inserção clínica, profundidade de sondagem menor ou igual a 2 mm e ausência de sangramento à sondagem (VENTURIM; JOLY; VENTURIM, 2011).

Há poucos dados disponíveis sobre o sucesso dos dispositivos artificiais para a substituição dos enxertos autógenos de tecido mole, sendo necessária a área doadora do próprio paciente (CAIRO; PAGLIARO; NIERI, 2008; HAMMERLE; KARRING, 2000; NÚÑEZ et al., 2009).

2.4 Cicatrização

O processo cicatricial é comum a todas as feridas, independentemente do agente que a causou, apresentando-se de maneira sistêmica, dinâmica e diretamente relacionado às condições gerais do organismo (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007).

A lesão tecidual, ou seja, o estímulo inicial para o processo de cicatrização coloca elementos sanguíneos em contato com o colágeno e outras substâncias da matriz extracelular, provocando degranulação de plaquetas e ativação das cascatas de coagulação e do complemento. O resultado é a liberação de vários mediadores vasoativos e quimiotáticos que conduzem o processo cicatricial mediante atração de células inflamatórias para a região da ferida (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007).

Após qualquer terapia periodontal são desencadeadas cascatas celulares altamente organizadas e reguladas por vários mediadores químicos, fatores de crescimento além de outros reguladores ambientais e locais da ferida que comandam um processo denominado de cicatrização. A descrição de cicatrização da ferida após terapia periodontal reflete o fato de que a agressão terapêutica foi adicionada à agressão microbiana (ODA; CARVALHO, 2004).

A cicatrização ocorre como resposta a vários tipos de injúrias, objetivando o restabelecimento da estrutura e da função tecidual, podendo se desenvolver por meio de dois processos: regeneração e reparo (ODA; CARVALHO, 2004).

Em periodontia, o termo regeneração refere-se à restauração completa dos tecidos danificados, proliferação e diferenciação dos elementos do parênquima original. Regenerar significa que uma nova inserção (formação de novo cimento, novo osso alveolar e novo ligamento periodontal) foi interposta nos locais onde havia sido perdida. Além disso, regenerar também tem relação com a formação de inserção do epitélio juncional ao dente e ao restabelecimento funcional da orientação das fibras gengivais na lâmina própria após a cicatrização (ODA; CARVALHO, 2004).

O reparo, por sua vez, é uma regeneração incompleta, pois restabelece os tecidos perdidos por tecido conjuntivo não especializado que forma fibrose e eventualmente uma cicatriz. Deste modo, os tecidos danificados são substituídos por tecidos cuja função não é,

necessariamente, àquela do tecido original. Em periodontia, o termo reparo tem sido descrito como adesão colagenosa, reparo por tecido conjuntivo ou qualquer variação de nova inserção colagenosa na superfície de raiz debridada (ODA; CARVALHO, 2004).

Na cicatrização, eventos como a inflamação, a proliferação celular, a formação do tecido de granulação, contração e remodelamento da ferida são observados, tendo sido descritos por Carrel em 1910. Recentemente, a cicatrização e suas etapas foram divididas em três fases distintas por Clark (2005), quais sejam, a fase inflamatória, fase de proliferação ou de granulação e a fase de remodelamento ou de maturação (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007).

O cirurgião deve ter conhecimento das etapas fisiológicas do reparo das feridas. A divisão das fases do processo de cicatrização se dá em: inflamatória, proliferativa (reepitelização, síntese da matriz e neovascularização) e de remodelação que ocorrem de forma contínua e temporal (CLARK, 1996; TAZIMA; VICENTE; MORIYA, 2008).

2.4.1 Fase inflamatória

Esta fase se inicia imediatamente após a lesão, com a liberação de substâncias vasoconstritoras, principalmente tromboxana A₂ e prostaglandinas, pelas membranas celulares. O endotélio lesado e as plaquetas estimulam a cascata da coagulação, tendo papel fundamental na cicatrização. Esta cascata é iniciada objetivando a hemostasia, e grânulos são liberados das plaquetas, as quais contêm fator de crescimento de transformação beta (TGF- β) (e também fator de crescimento derivado das plaquetas [PDGF], fator de crescimento derivado dos fibroblastos [FGF], fator de crescimento epidérmico [EGF], prostaglandinas e tromboxanas), que atraem neutrófilos à ferida. O coágulo é formado por colágeno, plaquetas e trombina, que servem de reservatório proteico para síntese de citocinas e fatores de crescimento, aumentando seus efeitos. Com isto, a resposta inflamatória se inicia com vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, promovendo a quimiotaxia (migração de neutrófilos para a ferida) (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006).

Os neutrófilos são as primeiras células a chegar à ferida, com maior concentração 24 horas após a lesão, e são atraídos por substâncias quimiotáticas liberadas por plaquetas. Os neutrófilos aderem à parede do endotélio mediante ligação com as selectinas (receptores de membrana), produzindo radicais livres que auxiliam na destruição bacteriana e são gradativamente substituídos por macrófagos (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006).

Após a lesão tecidual inicia-se a hemostasia e inflamação, fazendo parte desta fase um aumento na permeabilidade vascular, migração de células para a ferida por quimiotaxia, secreção de citocinas e fatores de crescimento na ferida e ativação de células migrantes. As quimiocinas promovem a migração de células inflamatórias e desempenham papel fundamental na regulação das fases da cicatrização. Os macrófagos têm importante papel pois orquestram a liberação de citocinas e incitam muitos dos processos subsequentes de cicatrização (TOWNSEND JÚNIOR et al., 2015).

Os macrófagos migram para a ferida após 48 – 96 horas da lesão, e são as principais células antes dos fibroblastos migrarem e iniciarem a replicação, pois são fundamentais no término do debridamento iniciado pelos neutrófilos e sua maior contribuição é a secreção de citocinas e fatores de crescimento, além de contribuírem na angiogênese, fibroplasia e síntese de matriz extracelular, fundamentais para a transição para a fase proliferativa (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006).

2.4.2 Fase proliferativa

Após cessarem as respostas agudas de hemostasia e inflamação começam a angiogênese, fibroplasia e epitelização (TOWNSEND JÚNIOR et al., 2015).

A fase proliferativa é constituída por quatro etapas fundamentais: epitelização, angiogênese, formação de tecido de granulação e deposição de colágeno. Esta fase tem início pelo 4º dia após a lesão e se estende aproximadamente até o término da segunda semana. A epitelização ocorre precocemente. Se a membrana basal estiver intacta, as células epiteliais migram em direção superior, e as camadas normais da epiderme são restauradas em três dias. Se a membrana basal for lesada, as células epiteliais das bordas da ferida começam a proliferar na tentativa de restabelecer a barreira protetora (LAWRENCE; DIEGELMANN, 1994).

A angiogênese é estimulada pelo fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), e é caracterizada pela migração de células endoteliais e formação de capilares, essencial para a cicatrização adequada (LAWRENCE; DIEGELMANN, 1994).

A parte final da fase proliferativa é a formação de tecido de granulação. Os fibroblastos e as células endoteliais são as principais células da fase proliferativa. Os fibroblastos dos tecidos vizinhos migram para a ferida, porém precisam ser ativados para sair de seu estado de quiescência. O fator de crescimento mais importante na proliferação e

ativação dos fibroblastos é o PDGF. Em seguida é liberado o TGF- β , que estimula os fibroblastos a produzirem colágeno tipo I e a transformarem-se em miofibroblastos, que promovem a contração da ferida (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006).

Os novos vasos sanguíneos são formados a partir de vasos preexistentes. Os vasos neoformados constituem o tecido de granulação provisório e suprem de nutrientes e de oxigênio o tecido em crescimento. A angiogênese ocorre na matriz extracelular do leito da ferida com a migração e estimulação mitogênica das células endoteliais (MENDONÇA; COUTINHO-NETTO, 2009).

Entre os fatores de crescimento envolvidos no processo cicatricial podem ser citados o PDGF, que induz a proliferação celular, a quimiotaxia e a síntese matricial; o fator epidérmico, que estimula a epitelização; o fator transformador alfa, responsável pela angiogênese e pela epitelização; o fator fibroblástico, que estimula a proliferação celular e angiogênese e o fator transformador beta, responsável pelo aumento da síntese matricial (WITTE; BARBUL, 1997).

2.4.3 Fase remodelagem

Na remodelagem ou maturação, a ferida se contrai em um movimento centrípeto, podendo ocorrer por interação complexa dos materiais extracelulares com os fibroblastos (TOWNSEND JÚNIOR et al., 2015). A remodelagem caracteriza-se por um aumento de resistência, sem aumentar a quantidade de colágeno e a síntese de fibras colágenas é um evento contínuo que se estende até o final do processo de reparo enquanto ocorre a remodelação tecidual (TAZIMA; VICENTE; MORIYA, 2008).

A característica mais importante dessa fase é a deposição de colágeno de maneira organizada, por isso é a mais importante clinicamente. O colágeno produzido inicialmente é mais fino do que o colágeno presente na pele normal, e tem orientação paralela à pele. Com o tempo, o colágeno inicial (colágeno tipo III) é reabsorvido e um colágeno mais espesso é produzido e organizado ao longo das linhas de tensão. Todas estas mudanças se refletem em aumento da força tênsil da ferida. A reorganização da nova matriz é um processo importante da cicatrização, que se dá quando os fibroblastos e leucócitos secretam collagenases que promovem a lise da matriz antiga (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006).

O colágeno é o principal componente da matriz extracelular dos tecidos, estruturando-se em rede densa e dinâmica resultante da sua constante deposição e reabsorção. A quantidade de colágeno modifica-se no cólon durante o pós-operatório de anastomoses colônicas,

principalmente na região peri-anastomótica. Tal variação é resultado da interação entre sua síntese, fixação e degradação no tecido cicatricial (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006).

A cicatrização é considerada bem-sucedida quando há equilíbrio entre a síntese da nova matriz e a lise da matriz antiga, havendo sucesso quando a deposição é maior. Aqui, cabe destacar que mesmo após um ano, a ferida apresentará um colágeno menos organizado do que o da pele sã, e a força tênsil jamais retornará a 100%, atingindo em torno de 80% após três meses (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006).

A Figura 4 traz as três fases da cicatrização.

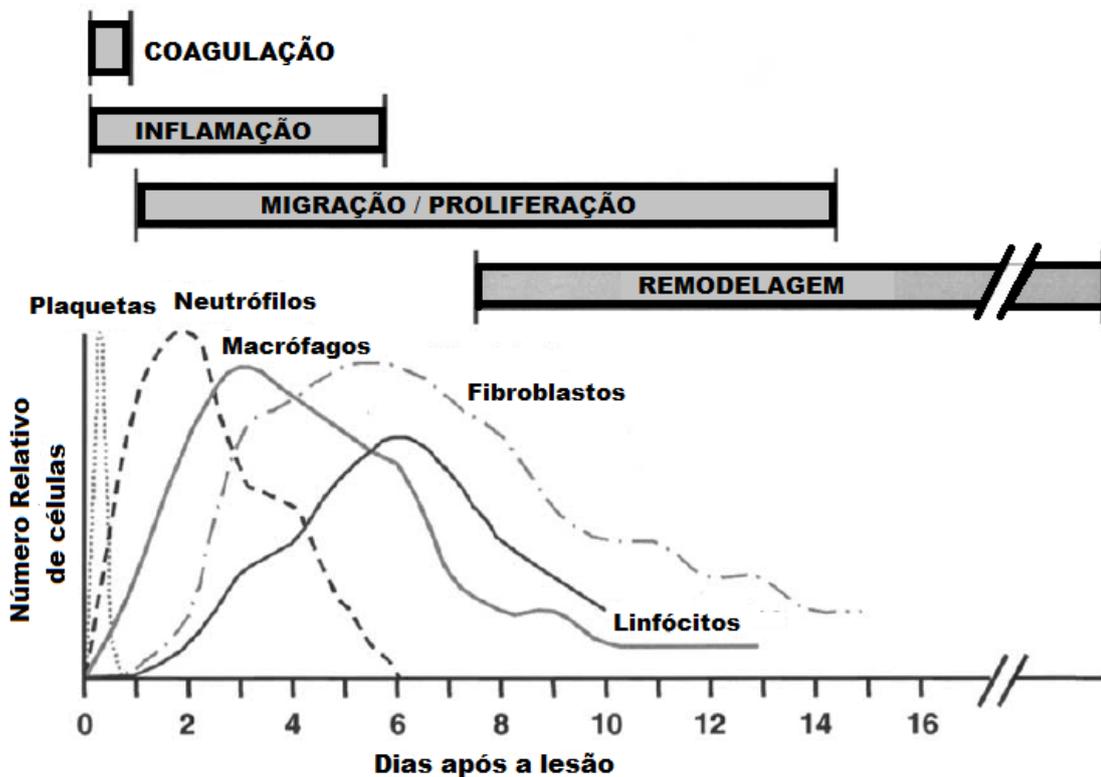


Figura 4 – Representação esquemática da especificidade celular correlacionada no tempo com as fases da cicatrização.

Fonte: Adaptado de Park; Barbul (2004).

O processo de cicatrização da mucosa oral requer múltiplos passos, tais como a angiogênese, migração dos fibroblastos e reepitelização (ODA; KAGAMI; UEDA, 2004). A cicatrização de incisões cirúrgicas depende da capacidade do tecido conjuntivo se regenerar, sendo o fibroblasto a principal célula envolvida neste processo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). No processo de cicatrização dos enxertos gengivais livres, a área doadora ficará sem cobertura, causando dor e desconforto para o paciente durante o processo de cicatrização (HOFMANNER et al., 2012). Lindhe (2005) afirmou que cicatrização satisfatória ocorre em

3-4 semanas após a retirada de um enxerto e que o palato retorna à conformação aproximadamente 3 meses depois da cirurgia.

Choi et al., (2013) propuseram um estudo com um hidrogel de acetona de triamcinolona-carregada preparado por irradiação de feixe de elétrons e avaliaram sua utilização como um sistema de administração de fármaco mucoadesivo bucal. E tiveram como resultado o fato de que este hidrogel pode ser um poderoso meio de entrega de drogas para administração bucal com liberação controlada e nenhuma irritação dos tecidos. Inúmeras plantas medicinais e produtos naturais têm sido estudados com intuito de avaliar seu potencial de cicatrização de feridas, tais como a aloe vera (*Aloe barbadensis*), que tem sido utilizada para induzir a cicatrização de feridas (JETTANACHEAWCHANKIT et al., 2009).

Mariano et al., (2015) observaram em seu trabalho que o uso das pastas de clorexidina e metronidazol em feridas no palato de ratos resultou em uma epitelização mais rápida clínica e histologicamente. O controle microbiano com estas substâncias permitiu acelerar a epitelização e o fechamento da ferida.

Oda, Kagami e Ueda (2004) realizaram um estudo utilizando o fator básico de crescimento de fibroblasto (bFGF) examinando sua capacidade de acelerar a reparação tecidual na ferida da mucosa oral de ratos e os resultados deste estudo sugeriram a possibilidade de desenvolver uma terapia promissora com fatores de crescimento para pacientes que apresentam cicatrização deficiente.

Acelerar o processo de cicatrização das feridas pode reduzir o risco de infecção e desconforto aos pacientes (ZHU et al., 2015).

Portanto, propõe-se o uso de tais substâncias como a colagenase e o cloranfenicol.

2.5 Ação da colagenase e do cloranfenicol

No processo de cicatrização, tanto o tecido de granulação como a epitelização têm relevância, principalmente no que se refere ao entendimento de aspectos da neoformação tecidual, assim como na observância dos efeitos de medicação sistêmica ou tópica na evolução do processo cicatricial. Isto se deve ao fato de que a infecção retarda o processo cicatricial e muitos microrganismos encontrados nas feridas são usualmente patógenos, podendo ainda ser deletérios à cicatrização, apesar de pertencerem à flora bacteriana da pele (FRANCO; GONÇALVES, 2008).

Nesse contexto, os curativos são uma forma de tratamento das feridas cutâneas e sua escolha depende de fatores intrínsecos e extrínsecos. O tratamento das feridas cutâneas é

dinâmico e depende, a cada momento, da evolução das fases de cicatrização. Atualmente, são inúmeras as opções de curativos existentes e, embora haja uma grande variedade de curativos, sua função se resume a prevenir a desidratação do tecido que leva à morte celular, acelerar a angiogênese, estimular a epitelização e a formação do tecido de granulação, facilitar a remoção de tecido necrótico e fibrina, servir como barreira protetora contra microrganismo, promover a diminuição da dor, evitar a perda excessiva de líquidos e evitar traumas na troca do curativo (FRANCO; GONÇALVES, 2008).

A fim de promover a cicatrização, as pomadas enzimáticas são compostas de enzimas específicas para determinados substratos com o objetivo de auxiliar no debridamento da lesão. Entretanto, não há dados conclusivos sobre sua ação como estimulador do processo cicatricial (SHEETS et al., 2016).

O debridamento, ou seja, a remoção de tecido doente e não viável é fundamental na avaliação e preparo da ferida para terapias de cura. A remoção de tecido necrótico e cicatricial através de métodos cirúrgicos ou mecânicos é menos específica e pode ser dolorosa para os pacientes. Agentes de debridamento enzimático, como a colagenase clostridial promove a degradação seletiva e indolor do tecido desvitalizado (SHEETS et al., 2016).

A colagenase é uma enzima proteolítica que apresenta a propriedade de decompor o colágeno. A colagenase promove o reparo do leito da ferida por meio da limpeza enzimática das áreas lesadas, com uma cicatrização uniforme e de forma mais rápida. As vantagens apresentadas pela colagenase na prática clínica são a remoção seletiva do tecido morto pela clivagem de filamentos de colágeno, o procedimento ser indolor sem sangramento, aumenta a formação de tecido de granulação, promove quimiotaxia de células inflamatórias e fibroblastos para a ferida (JUNG, 1998). A pomada de colagenase é um agente de debridamento enzimático derivado do *Clostridium histolyticum* (MCCALLON; WEIR; LANTIS, 2015).

No curativo com pomada enzimática, a colagenase age degradando o colágeno nativo da ferida, sendo indicada em feridas com tecido desvitalizado. A contraindicação está relacionada a feridas com cicatrização por primeira intenção. O uso de antibióticos na prevenção e tratamento das infecções de lesões promove uma redução significativa nas porcentagens de infecção (FRANCO; GONÇALVES, 2008).

Além de suas atividades de debridamento, a colagenase clostridial altamente purificada promove ativamente a cicatrização e estudos anteriores revelam que as matrizes extracelulares digeridas com esta enzima produzem peptídeos que ativam respostas celulares

migratórias, proliferativas e angiogênicas a lesões *in vitro* e promovem o fechamento da ferida *in vivo* (SHEETS et al., 2016).

Um estudo duplo cego, realizado por Helaly et al. (1988), avaliou a eficácia e tolerabilidade de três formulações de limpeza enzimática de feridas (colagenase/cloranfenicol = I; DNase fibrinolisinina = F; e concentrado de colagenase = Im). Não houve diferença de eficácia e tolerabilidade entre os produtos com colagenase, mas ambos diferiram significativamente do grupo com a formulação DNase fibrinolisinina ($p < 0,005$). A colagenase proporciona rápida cicatrização da ferida (média de 9 dias versus 20 dias F). Os autores concluíram que os produtos com colagenase devem ser considerados como superiores às formulações inespecíficas.

A ação da pomada colagenase é ideal no pH entre 6 e 8 e encontra-se este pH na cavidade oral. Resultados de estudos imunológicos mostram que não há evidências de absorção sistêmica da pomada colagenase após aplicação na pele intacta ou em áreas de ulceração. Portanto, não foram desenvolvidos extensos estudos toxicológicos em sua utilização recomendada (RILEY; HERMAN, 2005).

Em feridas com tecido desvitalizado, o ideal é lavar a ferida com soro fisiológico a 0,9%. Aplicar 2 mm da pomada sobre a área a ser tratada e colocar gaze de contato úmida, ocluindo com gaze de cobertura seca para fixar, a cada 24 horas. Há controvérsias quanto à eficácia das pomadas enzimáticas como estimulador da granulação e epitelização, visto que com o aumento dos níveis de ação das proteinases, tem-se a degradação dos fatores de crescimento e dos receptores de membrana celular, que são importantes para o processo de cicatrização (RILEY; HERMAN, 2005).

O cloranfenicol é um antibiótico bacteriostático de amplo espectro derivado de *Streptomyces venezuelae*. Foi isolado pela primeira vez a partir do microrganismo *Streptomyces venezuela*. Atualmente, o cloranfenicol é sintetizado e somente o isômero *R,R* é ativo. O cloranfenicol liga-se à subunidade 30S do ribossomo e parece inibir o movimento dos ribossomos ao longo do mRNA, provavelmente pela inibição da peptidil transferase, responsável pela extensão da cadeia peptídica. Uma vez que o cloranfenicol se liga à mesma região que os macrolídeos e as lincosamidas, eles não podem ser administrados em associação. Os grupamentos nitro e ambos grupamentos álcool estão envolvidos nas interações. O grupo dicloroacetamida também é importante, porém pode ser substituído por outros grupos eletronegativos (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

Por tais características, é utilizado na formulação para conter as infecções bacterianas locais que, secundariamente, podem estar presentes. É um antibiótico de largo espectro com

ação contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e pouca evidência de resistência adquirida (JUNG, 1998).

Os antibióticos semissintéticos eficazes para o tratamento de patógenos Gram positivo e Gram negativo, análogos aos antibióticos naturais já existentes. A maioria deles foi obtida a partir de protótipos naturais microbianos, como derivados β -lactâmicos (análogos de penicilina e cefalosporina, ácido clavulânico, aztreonam), análogos da tetraciclina, derivados aminoglicosídicos (gentamicina, tobramicina, amicacina) (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

O conhecimento dos mecanismos bioquímicos e genéticos envolvidos na resistência bacteriana no processo de cicatrização é de grande importância para se entender como a bactéria pode desenvolver a resistência e, conseqüentemente, comprometer tal processo. Apesar de tais mecanismos variarem de patógeno para patógeno, a resistência é causada por alguns fatores básicos, tais como a inativação do antibiótico diretamente na molécula bioativa por alterações químicas, geralmente promovidas por enzimas bacterianas; a modificação do alvo que leva à perda de sensibilidade ao antibiótico; mudanças na bomba de efluxo e permeabilidade externa da membrana que promovem a redução da concentração do antibiótico sem sua modificação química; transmissão do alvo, ou seja, quando algumas bactérias se tornam insensíveis a alguns antibióticos porque são capazes de transmitir a inativação de uma determinada enzima, o que quer dizer que os antibióticos com mecanismos de ação que envolvem inibição enzimática tornam-se inativos por não terem o alvo para atuar (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

No reparo tecidual, a colagenase e o cloranfenicol, podem vir para acelerar a cicatrização da ferida na área doadora para enxertos gengivais, ao contribuir para a formação de fibras colágenas, detendo a presença de células inflamatórias, otimizando o tecido de granulação, favorecendo a neoformação vascular e a neoformação epitelial proporcionando, ao final do processo de cicatrização, um pós-operatório com menor morbidade aos pacientes, conforme traz a investigação proposta pelo presente estudo.

2.6 Parâmetros fisiológicos

Segundo Guyton (1997) o fígado é um órgão de vital importância para o funcionamento do organismo. Antes denominada de transaminase glutâmico-pirúvica (GPT) a ALT (alanina aminotransferase) é uma enzima encontrada livre no plasma dos hepatócitos e após o seu rompimento ela é liberada na corrente circulatória (THRALL et al., 2007). Processos

inflamatórios e também medicamentos podem induzir a lesão hepato-celular e a liberação de ALT para a corrente circulatória de animais (GONZALEZ; SILVA, 2006). Portanto quando temos uma lesão hepática há refluxo de AST E ALT para o plasma com elevação dos níveis de ambas as enzimas, sendo que a ALT sobe ligeiramente mais do que a AST se a lesão for puramente hepática. Devido a ingestão consequente da aplicação tópica na cavidade oral dos compostos pelos animais foi proposto que se realizasse o teste de toxicidade sistêmica verificando os parâmetros descritos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Comitê de ética

O presente estudo foi iniciado após a apreciação e aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Animais da Universidade Federal de Alfenas – MG, protocolo: 31/2017 (ANEXO A).

3.2 Animais

Ratos da linhagem *Rattus norvegicus*, *albinus*, *Wistar*, machos adultos com 400 gramas foram utilizados no presente estudo. Os 48 animais foram mantidos em caixas devidamente identificadas, sendo um animal por caixa, com ciclo de luz controlada (12 horas claro, 12 horas escuro), em ambiente com temperatura variando entre 22 e 24°C, e consumo de ração sólida e tiveram o acesso livre à água, durante todo o período experimental. As seguintes experiências foram conduzidas conforme o protocolo no Manual de Utilização do Biotério Central da Unifal – MG.

3.2.1 Grupos experimentais e tratamento

Os 48 animais foram divididos em 4 grupos:

Grupo I: O controle negativo que após o procedimento receberá aplicação tópica de vaselina uma vez ao dia por 3 dias e teste de toxicidade sistêmica.

Grupo II: Após o procedimento receberá aplicação de colagenase uma vez ao dia por 3 dias e teste de toxicidade sistêmica.

Grupo III: Após o procedimento receberá aplicação de colagenase e cloranfenicol pomadal uma vez ao dia por 3 dias e teste de toxicidade sistêmica.

Grupo IV: Após o procedimento receberá aplicação de cloranfenicol uma vez ao dia por 3 dias e teste de toxicidade sistêmica.

Nos dias 1, 5, 7 e 10 após o tratamento, três animais de cada grupo foram eutanasiados e as áreas das feridas medidas usando software Imagem J com fotografias tiradas a mesma distância. Sendo esta medida padronizada por um aparato com medida de 15 centímetros padronizado após a melhor focalização do objeto pela câmera.

A aplicação da droga foi feita com um *microbrush* (Aplicador Kg Brush-KG Sorensen), porção de 0,05 ml e aplicada uniformemente, com fricção na região por 30 segundos.

3.3 Procedimento cirúrgico e medição de ferida

Os animais foram tratados pelo mesmo operador e anestesiados por injeção intraperitoneal de xilazina (10mg/kg) (Rompum®, Bayer, Brasil) e quetamina (90mg/kg), (Dopalen®, Vetbrands, Brasil), e contidos em uma mesa operatória (Figura 5), que permitiu sua imobilização após anestesia geral e manutenção da boca aberta. Foi realizada anestesia local infiltrativa com lidocaína 1% com epinefrina (1:100.000) para promover anestesia local. Foi realizado um defeito na mucosa de 4 mm de diâmetro até a profundidade do perióstio usando uma lâmina de aço inoxidável redonda projetada para punção biópsia (Punch, Rhosse®). No momento da cirurgia foi descartado o tecido excisionado (Figura 6). A dose analgésica de 0,5 ml de fosfato de codeína 20mg/Kg (ampola 30mg/2mL), foi realizada por via intraperitoneal. As doses analgésicas foram administradas ao final do procedimento, e por mais 3 dias, de 24/24 horas.

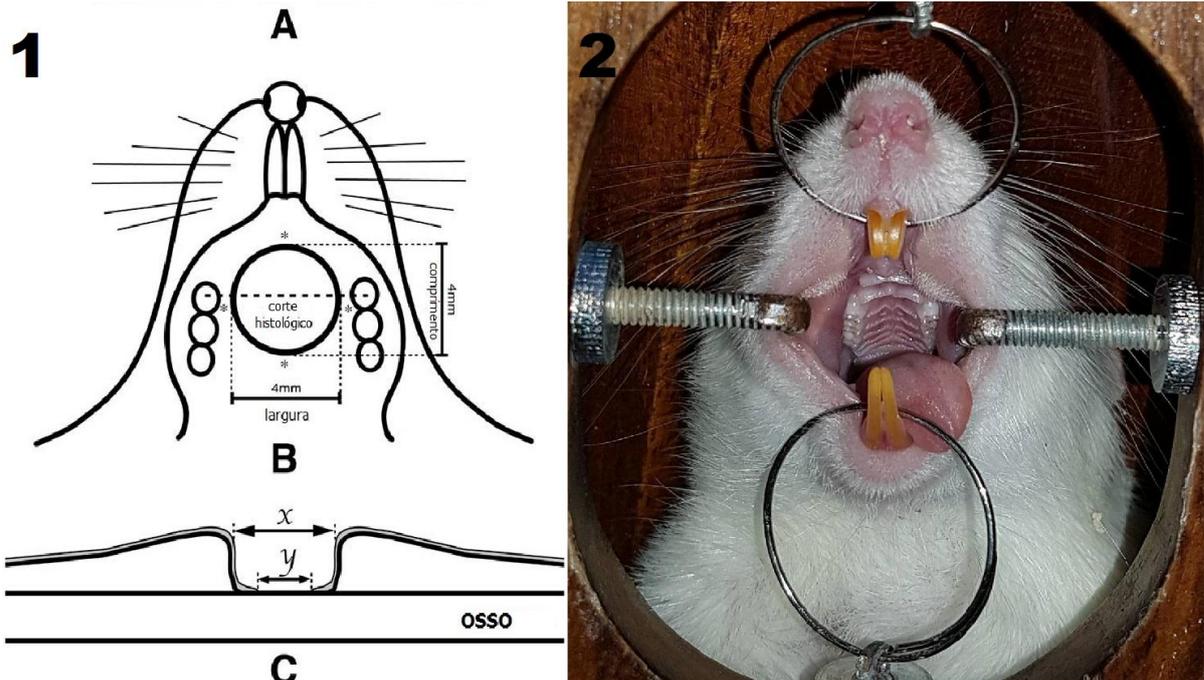


Figura 5 – 1: A - Animal no momento da cirurgia. B - Modelo da ferida no palato do rato. Os asteriscos mostram os locais de infiltração anestésica. A linha a tracejado na figura corresponde à superfície de corte mostrada em C. C - Diagrama de secção transversal de histológico da ferida. (X, espaço do tecido de granulação; y, espaço do tecido epitelial). 2: Imobilização do animal para manutenção da boca aberta após anestesia geral.

Fonte: ODA; KAGAMI; UEDA (2004) e do autor.

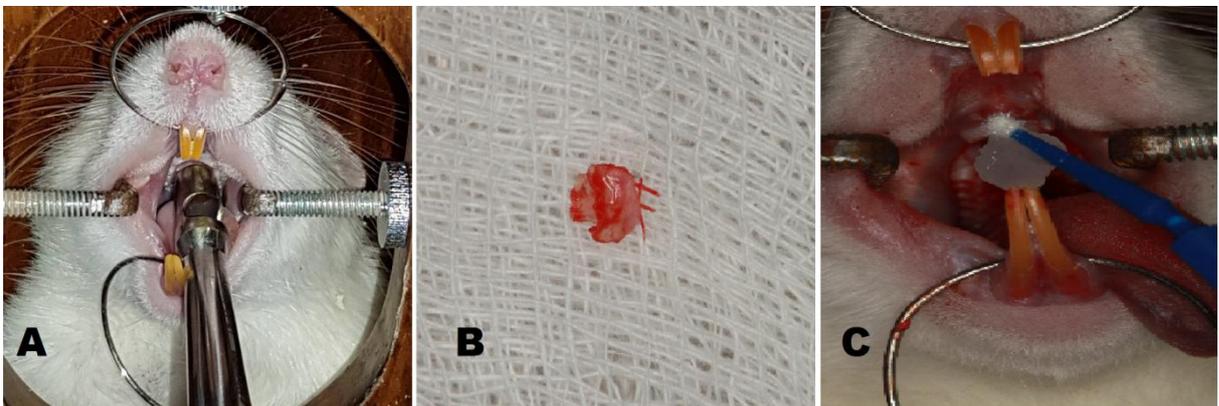


Figura 6 – A - Realização do defeito na mucosa com um Punch de 4 mm de diâmetro. B - Tecido excisionado. C - Aplicação do composto na ferida com o *microbrush*.

Fonte: Autor.

Após a confecção da ferida em palato foi realizada a aplicação dos respectivos materiais, vaselina no grupo de controle negativo grupo I 1 vez ao dia, por 3 dias e teste de toxicidade sistêmica. O grupo II recebeu a aplicação da colagenase 1 vez ao dia, por 3 dias e teste de toxicidade sistêmica. O grupo III recebeu a aplicação da colagenase e cloranfenicol 1 vez ao dia, por 3 dias e teste de toxicidade sistêmica. O grupo IV, cloranfenicol 1 vez ao dia, por 3 dias e teste de toxicidade sistêmica. O acompanhamento foi feito todos os dias para avaliação clínica e aplicação dos respectivos compostos.

No teste de toxicidade sistêmica foram avaliados os seguintes parâmetros fisiológicos aspartato amino transferase (AST) e alanina amino transferase (ALT) colhidos por punção cardíaca 8 ml de sangue e realizada a análise na amostra de soro pelo equipamento Labmax Pleno no Laboratório de Bioquímica Clínica –FCF – UNIFAL-MG.

O ImageJ é um software para processamento e análise de imagens, este software é possível exibir, editar, analisar, processar, salvar e imprimir imagens. Permite o processamento de diversos formatos de imagem como TIFF, GIF, JPEG, BMP, DICOM e FITS. No ImageJ, o cálculo das áreas é feito pela contagem de pixels das regiões selecionadas pelo usuário ou por um algoritmo específico (RASBAND, 2011). A área da ferida foi calculada pelo programa ImageJ demarcando as regiões das bordas das feridas e calculando nas imagens fotografadas a área em mm² nos dias 1, 5, 7 e 10.

3.4 Eutanásia

Em conformidade com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) para a prática da eutanásia, o método escolhido deve garantir a perda de consciência de forma rápida, irreversível e desprovida de experiência emocional ou física desagradável, ou seja, o animal não deve apresentar dor, estresse, apreensão ou ansiedade. O método escolhido foi a eutanásia por punção cardíaca após anestesia. Os dias selecionados para eutanásia foram 1, 5, 7 e 10 dias.

3.4.1 Obtenção do espécime

O material foi removido com uma trefina de 10 mm de diâmetro, operando com motor elétrico sob irrigação constante, permitindo obter uma margem de segurança 3 mm ao redor da ferida (Figura 7).

A remoção foi realizada em tecido ósseo e tecido mole.

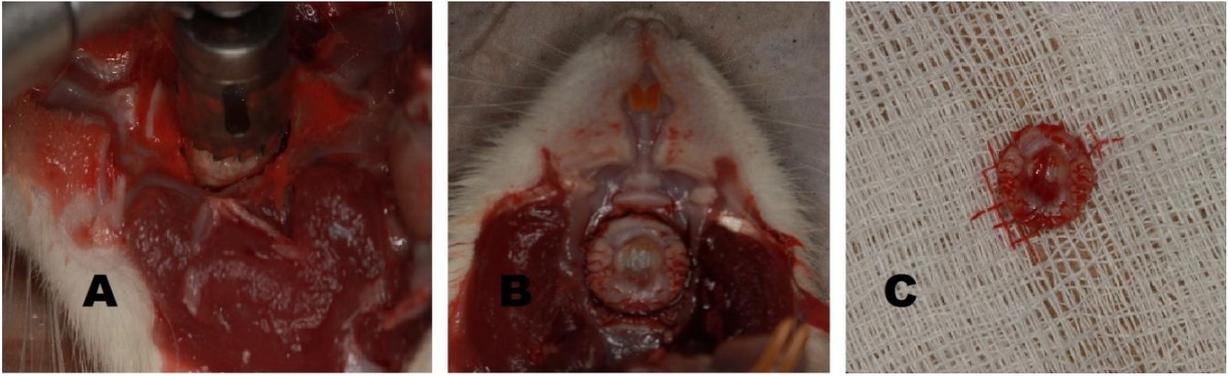


Figura 7 – A - Utilização da trefina de 10 mm. B - Aspecto circular após penetração da trefina. C - Espécime removido.

Fonte: Autor.

3.5 Análise histológica

As amostras dos tecidos colhidas em 1, 5, 7 e 10 dias após a cirurgia foram processadas para rotina histológica. Os espécimes de tecido excisados foram fixados em formol a 10%, embebidos em parafina, e seccionados em peças de 5- μ m. Foi realizada a descalcificação dos espécimes com EDTA. As secções foram coradas com hematoxilina e eosina (H-E) e Tricômico de Masson para identificação de colágeno. E utilizado um microscópio óptico binocular (*AxioLab A1 Plus-Carl Zeiss*, Jena, Alemanha) contendo uma lente objetiva Achroplan de 40X 0,65, e fotografadas utilizando o *software AxioVision Rel 4.8.2 (Carl Zeiss*, Jena, Alemanha). Salvas no formato TIFF. Foram avaliadas, as secções coradas com H-E, a maturação do tecido conjuntivo, fibroblastos, fibras colágenas, células inflamatórias e neovascularização.

3.6 Análise estatística

As diferenças estatísticas entre os valores médios forão avaliadas por análise de variância (ANOVA) ao nível de significância de 5%.

Os resultados obtidos foram submetidos aos testes de Tukey e todos os testes foram avaliados utilizando 5% de significância ($P < 0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 Aspecto clínico das feridas

Após as eutanásias era possível observar com mais nitidez o aspecto clínico da ferida em palato sendo possível notar que os animais do grupo controle apresentavam-se com feridas em tons vermelhos intensos e com as bordas bem cruentas e que os animais tratados com os compostos colagenase e cloranfenicol as áreas estavam com aspecto mais limpo com tons de vermelhos menos intensos e as bordas bem definidas, e uma superfície mais regular no interior do defeito.

4.2 Área da ferida

Na análise ilustrativa do aspecto clínico da ferida nota-se diferentes características após a aplicação dos diferentes compostos, sendo assim, foi necessário mensurar a área da ferida em cada grupo pelo *software* Image J. Após as coletas das medidas foi realizada a análise estatística ANOVA com 5% de significância (Figura 11).

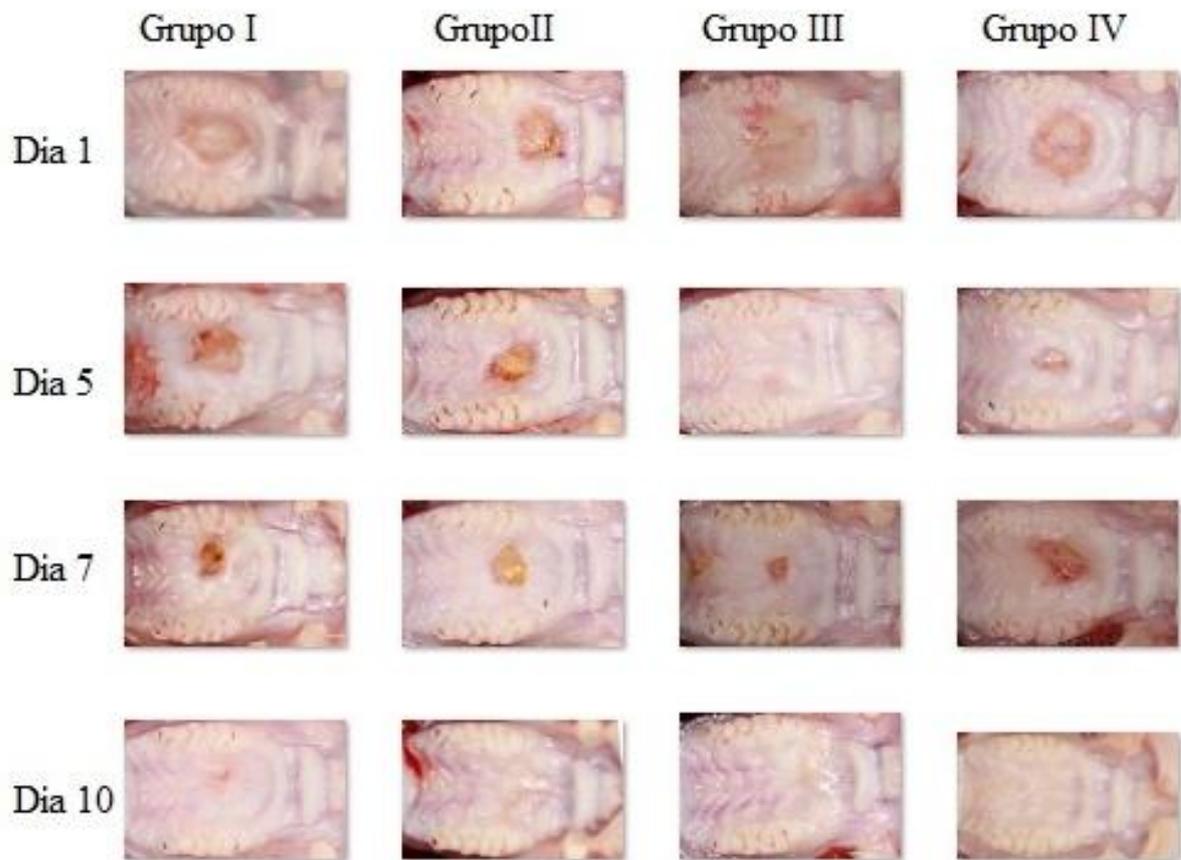


Figura 8 – Achados clínicos após tratamento com vaselina, colagenase, colagenase e cloranfenicol e cloranfenicol. Cicatrização da ferida observada nos dias 1, 5, 7 e 10.

Fonte: Autor.

Tabela 1 – Média das áreas da ferida de todos animais.

	Média das áreas da ferida
Grupo I	2.629750
Grupo II	3.089667
Grupo III	2.916417
Grupo IV	2.983250

*De acordo com o teste F, as médias não podem ser consideradas diferentes.

Portanto, não houve diferenças estatisticamente significativas nos tratamentos realizados considerando a área das feridas.

4.3 Toxicidade sistêmica

As análises das enzimas transaminases (ALT e AST) são importantes indicadores de lesões nas células hepáticas (MARTIN et al., 1981). Para análise destes parâmetros foram

coletados aproximadamente 8 ml de sangue de cada animal, centrifugados e o soro separado foi congelado e processado no Labmax Plenno.

Tabela 2 – Relação entre as médias dos grupos de parâmetros AST e ALT (U / L).

	Média - AST	Média – ALT
Grupo I	129.375 - b	50.750 – a
Grupo II	143.25 - ab	46.625 – a
Grupo III	140.5 - ab	53.125 – a
Grupo IV	159.25 - a	54.500 – a

1- Letras diferentes são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey com significância de 5%.

Portanto, o parâmetro ALT comporta-se com valores estatisticamente iguais, não havendo diferença entre os grupos e o AST apresenta diferença estatisticamente significativa entre os grupos I e IV, e os demais grupos se comportam com valores estatisticamente equivalentes.

4.4 Análises microscópicas descritivas

Nos cortes histológicos obtidos das feridas 1 dia após a última aplicação de seus respectivos tratamentos observou-se que o tecido epitelial estratificado pavimentoso queratinizado da mucosa palatal encontrava-se em ambas as extremidades do defeito confeccionado sem, no entanto, recobrir suas bordas. No interior da ferida encontrava-se debris constituídos de tecido conjuntivo em degeneração, com fibras colágenas colapsadas, coágulo com rede de fibrina e infiltrado inflamatório agudo (Figura 8). Nos cortes de feridas do Grupo III observou-se infiltrado inflamatório de intensidade mais leve comparado aos demais grupos.

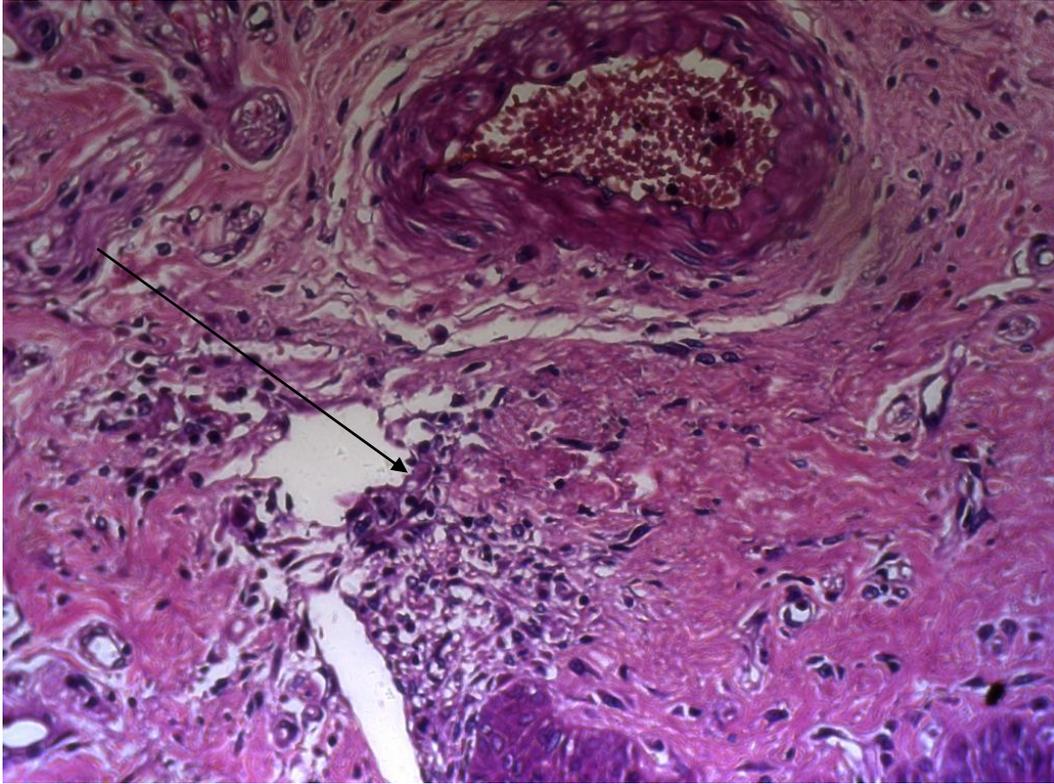


Figura 9 – Seta indicando o infiltrado inflamatório.
Fonte: Autor.

Já nos cortes histológicos do grupo 5 dias em todos animais observou-se que o tecido epitelial cobria parcialmente as bordas da ferida, demonstrando o início de sua fase proliferativa. O tecido de granulação, constituído de fibroblastos jovens e capilares recém-formados, pode ser observado em formação na região entre o osso e os debris superficiais que preenchem a área em reparo. Não foram observadas fibras colágenas nessa região, e o infiltrado inflamatório agudo permanecia. Uma amostra do Grupo II (Figura 9) e uma do Grupo III apresentaram-se completamente reepitelizadas, no entanto, este epitélio recém-formado era menos espesso e com menor prevalência de papilas conjuntivas comparado ao tecido epitelial pré-existente.

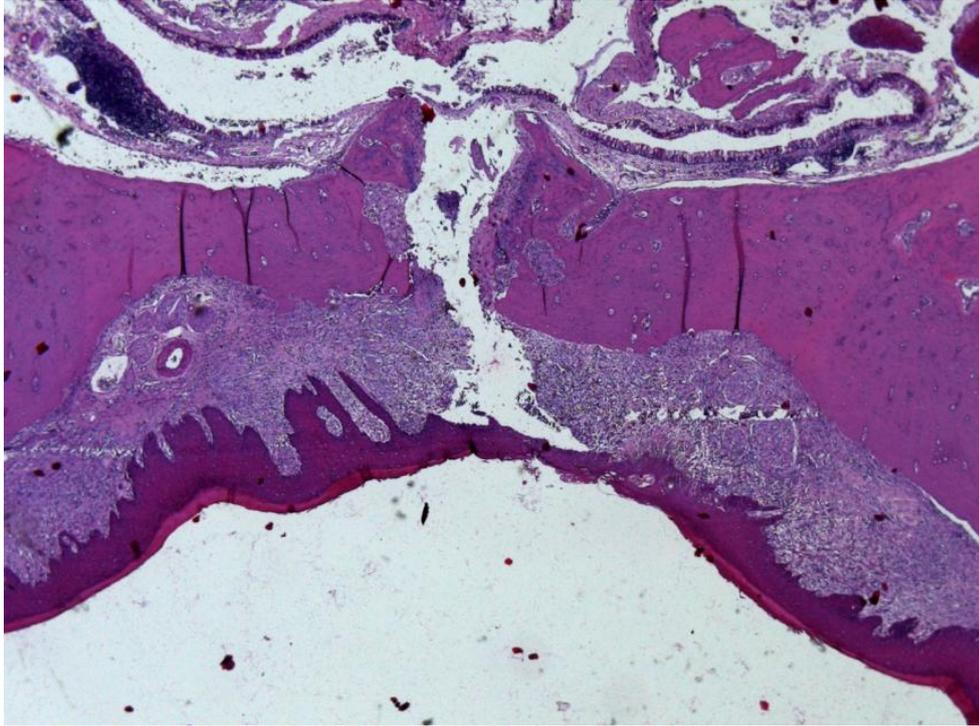


Figura 10 – Amostra do Grupo II.
Fonte: Autor.

Sete dias após o tratamento observou-se nos cortes histológicos que o tecido epitelial apresentava-se cobrindo as bordas das feridas em todos os tipos de tratamento. O tecido de granulação no interior da ferida apresentava-se entremeado por algumas fibras colágenas delgadas e infiltrado inflamatório de intensidade leve a moderada. Duas amostras do Grupo III e uma amostra do Grupo I apresentaram-se totalmente reepitelizadas com tecido conjuntivo subjacente contendo fibras colágenas delgadas e infiltrado inflamatório leve.

No período mais longo avaliado, que foi de 10 dias após o tratamento da ferida, observou-se que esta encontrava-se completamente reepitelizada na maioria das amostras (Figura 10), com exceção de uma amostra do Grupo III, cujo epitélio mantinha-se cobrindo apenas as bordas da ferida. Nas amostras completamente reepitelizadas o tecido epitelial apresentava-se espesso tanto com relação ao número de camadas celulares quanto à queratinização. As papilas conjuntivas eram diversas e proeminentes. No tecido conjuntivo observou-se fibras colágenas de densidade média e espessas, além de infiltrado inflamatório leve.

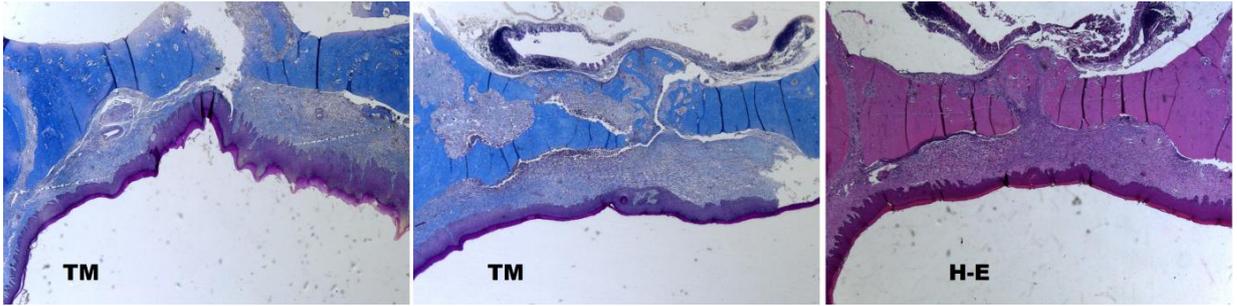


Figura 11 – Imagem microscópica - 5x tirada do microscópio óptico binocular (AxioLab A1 Plus-Zeiss) imagens dos animais do grupo II com tempo de eutanásia de 10 dias.

Carl

Fonte: Autor.

5 DISCUSSÃO

A principal área doadora para enxertias utilizada hoje pelos cirurgiões-dentistas é o palato duro e há poucos dados disponíveis sobre o sucesso dos dispositivos artificiais para a substituição dos enxertos autógenos de tecido mole, sendo necessária a área doadora do próprio paciente (HAMMERLE; KARRING, 2000; CAIRO; PAGLIARO; NIERI, 2008; NÚÑEZ et al., 2009), corroborando com o intuito da nossa pesquisa na busca de novos métodos de acelerar o processo de reparo das feridas cirúrgicas pois o procedimento resulta em duas feridas orais para o paciente .

O ambiente oral é extremamente dinâmico desta forma os alimentos, a saliva e água podem remover rapidamente os compostos aplicados topicamente e o trauma que ocorre na deglutição ao pressionar alimento contra o palato podem interferir negativamente no experimento, sendo assim necessário um modelo experimental com um aparato que protegeria a região palatina ou mesmo um veículo que permanecesse mais tempo aderido à superfície da mucosa como sugerem Choi et al. (2013).

A cicatrização de feridas é um processo complexo. Os fibroblastos se proliferam e produzem várias proteínas da matriz extracelular e fatores de crescimento (JETTANACHEAWCHANKIT et al., 2009). Desta forma, nota-se o aumento significativo das fibras colágenas nas imagens microscópicas nos dias 7 e 10 de todos os grupos e também a reepitelização observada nas lâminas das amostras coletadas de 10 dias encontravam-se completamente reepitelizadas e o tecido epitelial apresentava-se espesso tanto com relação ao número de camadas celulares quanto à queratinização. As papilas conjuntivas eram diversas e proeminentes.

A pomada colagenase tem sido amplamente utilizada em feridas dermatológicas e com excelentes resultados por sua atividade debridante (SHEETS et al., 2016), observou clinicamente que o aspecto da ferida com o uso da pomada era limpo e os tons vermelhos menos intensos. Ao observar os aspectos clínicos da ferida é bem evidente sua contração ilustrando como (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006) ao descrever as fases da remodelação.

Com intuito de não permitir a colonização bacteriana que atrasaria o processo de reparo foi proposto também o uso da colagenase com cloranfenicol, assim como proposto por MARIANO et al. (2015).

Pode-se relatar que para realização do presente projeto houve algumas limitações como a dificuldade no controle do tempo de contato dos compostos na superfície da mucosa,

cavidade oral do modelo com tamanho reduzido para colocação de aparatos que protegeriam a ferida e manteriam o composto por mais tempo no local, inviabilidade em realizar a aplicação do composto 3 vezes ao dia nos animais, número de modelos de estudo elevado e necessidade de um padrão de tamanho e idade, dificuldade para estimar um tempo médio de permanência da cavidade bucal do modelo e ausência de feedback do modelo quanto a sintomatologia ,

A aplicação tópica permite uma absorção maior na região aplicada, no entanto por se tratar de cavidade oral o animal deglute uma porção conseqüentemente sendo necessário portanto investigar sua toxicidade. Quanto a toxicidade dos compostos assim como Dantas et al. (2006) afirmou a importância de se estabelecer valores de referência próprios para cada biotério conclui-se que ausência de um valor referência nos parâmetros bioquímicos dos animais do biotério utilizados não comprova que o composto influenciaria nos valores coletados, ou outro fator local.

Organizado em camadas o tecido apresenta-se com células mais próximas à membrana basal formas cúbicas ou cilíndricas enquanto que as células mais próximas ao lúmen, achatadas (KIERSZENBAUM, 2012), podendo ser observados na nossa avaliação descritiva nos nosso achados microscópicos.

O colágeno é o principal componente da matriz extracelular dos tecidos (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006) sendo possível observar com a coloração de Tricrômico de Masson sua representatividade nas lâminas dos animais com o processo de cicatrização mais avançado.

A contração da ferida se dá em um movimento centrípeto (TOWNSEND JÚNIOR et al., 2015) sendo assim ela mantinha o padrão circular possibilitando observar clinicamente sua cicatrização. Ao realizar a comparação clínica entre as medidas das áreas das feridas era possível ver na tabela que os animais que receberam o tratamento com os compostos colagenase e cloranfenicol era menor nem relação as do grupo controle, porém ao realizar o teste estatísticos ele apresenta a média e torna os grupos estatisticamente equivalentes.

6 CONCLUSÃO

Neste estudo, o uso das pomadas não ocasionou em atraso ou deficiência no processo de reparo tecidual. Os resultados desta pesquisa permitem concluir que os compostos não apresentam toxicidade hepática. Não foram observadas alterações histopatológicas. A diferença foi observada apenas na avaliação clínica das feridas, apresentando um leito da ferida menos cruento com vermelho menos intenso. Nas avaliações das áreas da ferida, não há diferenças estatisticamente significantes. Portanto, faz-se necessárias mais pesquisas para que evidenciem resultados comprobatórios para o uso dos compostos.

REFERÊNCIAS

AFONSO, P. H.; GUIMARÃES, G. Avaliação dos níveis de recessão gengival presente em estudantes de odontologia da Faculdade São Lucas – Porto Velho – RO. **Saber Científico Odontológico**, Porto Velho, v. 2, n. 1, p. 1-11, jan./jun., 2012.

ARAÚJO, A. C. S. et al. Avaliação dos níveis de recessão gengival em estudantes de odontologia da Universidade Federal de Pernambuco. **RGO – Revista Gaúcha de Odontologia**, v. 55, n. 2, p. 139-42, 2007.

BERKOVITZ, B. K. B; HOLLAND, G. R.; MOXHAN, B. J. **Anatomia, embriologia e histologia bucal**. 3. ed. São Paulo: Artmed, 2004.

BEDNARZ, W. et al. A preliminary clinical comparison of the use of *fascia lata* allograft and autogenous connective tissue graft in multiple gingival recession coveragebased on the tunnel technique. **Advances in Clinical and Experimental Medicine**, v. 25, n. 3, p. 587-598, 2016.

BERTL, K. et al. Relative composition of fibrous connective and fatty/glandular tissue in connective tissue grafts depends on the harvesting technique but not the donor site of the hard palate. **Journal of Periodontology**, v. 86, n. 12, p. 1331-9, 2015.

BÍBLIA SAGRADA D. T. Romanos 2. ed. São Paulo Sociedade Bíblica do Brasil.1993. cap 11, p.189.

BROUGHTON, G. 2nd; JANIS, J. E.; ATTINGER, C. E. The basic science of wound healing. **Plastic Reconstruction Surgery**, v. 117(7 Suppl), p. 12S-34S, 2006.

CAIRO, F.; PAGLIARO, U.; NIERI, M. Treatment of gingival recession with coronally advanced flap procedures: a systematic review. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 35(8 Suppl), p. 136-62, sep. 2008.

CAMPISI, G. et al. Oral ulcers: three questions on their physiopathology. **Minerva Stomatology**, v. 56, n. 5, p. 293-302, may 2007.

CAMPOS, A. C. L.; BORGES-BRANCO, A.; GROTH, A. K. Cicatrização de feridas. **ABCD, Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, São Paulo, v. 20, n. 1, p. 51-58, mar. 2007.

CLARK, R. A. **The molecular and cellular biology wound repair**. 2nd ed. New York: Plenum Press,1996.

CHOI, S. G. et al. Topical treatment of the buccal mucosa and wounded skin in rats with a triamcinolone acetone-loaded hydrogel prepared using an electron beam. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 447, p. 102-108, 2013.

DANTAS, A. A. R., da SILVA, E. R. C., SAKO, J. S. Tratamento estético periodontal: revisão de literatura sobre alguns tipos de cirurgia. **Revista de Odontologia da Universidade da Cidade de São Paulo**, v. 24, n. 3, p. 226-34, set./dez. 2012.

DANTAS, et al. Valores de referência de alguns parâmetros fisiológicos de ratos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, Estado do Paraná. **Acta Sci. Health Sci. Maringá**, v. 28, n. 2, p. 165-170, 2006.

ESPINOSA, L.; SOSNIK, A.; FONTANILLA, M. R. Development and preclinical evaluation of acellular collagen scaffolding and autologous artificial connective tissue in the regeneration of oral mucosa wounds. **Tissue Engineering Part A**, v. 16, n. 5, p. 1667-79, may 2010.

FEITOSA, S. D. et al. Indicações atuais dos enxertos gengivais livres. **Revista Gaúcha de Odontologia**, v. 56, p. 1-6, 2008.

FERRÃO JÚNIOR, J. P. et al. Enxerto de tecido conjuntivo subepitelial – uma alternativa em cirurgia plástica periodontal. Caso clínico. **Revista Brasileira de Cirurgia e Periodontia**, v. 1, n. 4, p. 285-90, 2003.

FRANCO, D.; GONÇALVES, L. F. Feridas cutâneas: a escolha do curativo adequado. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, Rio de Janeiro, v. 35, n. 3, p. 203-206, mai./jun. 2008.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. da S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

GUYTON, A. C., Tratado de Fisiologia Médica, M, 9 ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, c. 70, p. 672, 1997.

HAMMERLE, C.; KARRING, T. Guided bone regeneration at oral implant sites. **Periodontology**, v. 17, p. 151-75, jun. 2000.

HELALY, P. et al. Wound healing impairment and topical enzymatic therapy: a multicentre doubleblind study. **Swiss Medical Journal (PRAXIS)**, v. 77, n. 52, p. 1428-34, 1988.

HOFMANNER, P. et al. Predictability of surgical techniques used for coverage of multiple adjacent gingival recessions--A systematic review. **Quintessence International**, v. 43, p. 545-54, 2012.

JUNG, W.; WINTER, H. Considerations for the use of clostridial collagenase in clinical practice. **Clinical Drug Investigation**, v. 15, n. 3, p. 245-252, mar. 1998.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

JETTANACHEAWCHANKIT, S. et al. Acemannan stimulates gingival fibroblast proliferation; expressions of keratinocyte growth factor-1, vascular endothelial growth factor, and type I collagen; and wound healing. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 109, n. 4, p. 525-30, apr. 2009.

KO, H-Y.; LU, H-K. Systematic review of the clinical performance of connective tissue graft and guided tissue regeneration in the treatment of gingival recessions of miller's classification grades I and II. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 2, n. 2, p. 63-71, 2010.

KIERSZENBAUM, Abraham L. **Histologia e biologia celular** – uma introdução à patologia. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

LAWRENCE, W. T.; DIEGELMANN, R. F. Growth factors in wound healing. **Clinical Dermatology**, v. 12, n. 1, p. 157-69, 1994.

LINDHE, J.; KARRING, T.; LANG, N. P. **Tratado de periodontia clínica e implantologia oral**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara e Koogan, 2005.

MARINI, M. G. et al. Gingival recession: prevalence, extension and severity in adults **Journal of Applied Oral Science**, Bauru, v. 12, n. 3, p. 250-255, Sep. 2004.

MARIANO, R. C. et al. Effect of topical application of chlorhexidine and metronidazole on the tissue repair of palatal wounds of rats: a clinical and histomorphometric study. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology**, v. 119, n. 5, p. 505-13, may. 2015.

MCCALLON, S. K.; WEIR, D.; LANTIS, J. C. Optimizing wound bed preparation with collagenase enzymatic debridement. **Journal of the American College of Clinical Wound Specialists**, v. 15, n. 6, p. 14-23, aug. 2015.

MICHAELIDES, P. L.; WILSON, S. G. An autogenous gingival graft technique. **International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry**, v. 14, n. 2, p. 112-25, 1994.

MILLER, P. D. A classification of marginal tissue recession. **International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry**, v. 5, n. 2, p. 8-13, 1985.

MONNET-CORTI, V.; BORGHETTI, A. Enxerto gengival epitélio-conjuntivo. **Cirurgia plástica periodontal**. Porto Alegre: Artmed, 2002.

NÚÑEZ, J. et al. Clinical and histological evaluation of an acellular dermal matrix allograft in combination with the coronally advanced flap in the treatment of Miller class I recession defects: An experimental study in the mini-pig. **Journal of Periodontology**, v. 36, n. 6, p. 523-31, may 2009.

ODA, J. Y.; CARVALHO, J. Cicatrização do periodonto: revisão. *Arq. Ciênc. Saúde Unipar*, Umuarama, v. 8, n. 2, p. 159-72, mai./ago. 2004.

ODA, Y.; KAGAMI, H.; UEDA, M. Accelerating effects of basic fibroblast growth factor on wound healing of rat palatal mucosa. **American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons**, v. 62, n. 1, p. 73-80, jan. 2004.

OLIVEIRA, B. V. et al. TNF-alpha expression, evaluation of collagen and TUNEL of *Matricaria recutita* L. extract and triamcinolone on oral ulcer in diabetic rats. **Journal of Applied Oral Science**, v. 24, n. 3, p. 278-90, may/jun.2016.

OTTONI, J.; MAGALHÃES, L. F. **Cirurgia plástica periodontal e periimplantar**. São Paulo: Artes Médicas, 2006.

PANDIT, N. et al. Comparison of two techniques of harvesting connective tissue and its effects on healing pattern at palate and recession coverage at recipient site. **Contemporary Clinical Dentistry**, v. 7, n. 1, p. 3-10, jan./mar. 2016.

PATEL, V. F.; LIU, F.; BROWN, M. B. Modeling the oral cavity: in vitro and *in vivo* evaluations of buccal drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 161, n. 6, p. 746-56, aug. 2012.

RANJBARI, A. et al. Clinical comparison of full and partial double pedicle flaps with connective tissue grafts for treatment of gingival recession. **Journal of Dentistry, Shiraz University of Medical Sciences**, v. 17, n. 3, p. 193-200, sep. 2016.

RASBAND, W., ImageJ documentation. Disponível em: <https://imagej.nih.gov/ij/>, acesso em 01/04/2018.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/> Ferreira, E. B., CAVALCANTI, P. P., NOGUEIRA, D. A. (2013). ExpDes: Experimental Designs package. R package version 1.1.2. 2016.

REINO, D. M. et al. Treatment of gingival recessions in heavy smokers using two surgical techniques: a controlled clinical trial. **Brazilian Dental Journal**, v. 23, n. 1, p. 59-67, 2012.

RICCI, G.; SILVESTRIN, M. TINTI, C. RAPERINI, G. A clinical/statistical comparison between the subpedicle connective tissue graft method and the guided tissue regeneration technique in root coverage. **International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry**, v. 16, n. 6, p. 38-45, 1996.

RILEY, K. N.; HERMAN, I. M. Collagenase promotes the cellular responses to injury and wound healing *in vivo*. **Journal of Burns and Wounds**, v. 4, n. 8, p. 112-24, may 2005.

RIZZOLO, R. J. C.; MADEIRA, M. C. **Anatomia facial com fundamentos de anatomia geral**. 3. ed. (reimpressão), São Paulo: Sarvier, 2010.

ROMAN, A. et al. Subepithelial connective tissue graft for root coverage: clinical case reports and histologic evaluation. **Rom J Morphol Embryol.** ; 51: p. 793–97, 2010.

SAADE, J.; BASSANI, M. Cirurgia plástica periodontal – recobrimento radicular. *In*: Cardoso, R. J. A.; Gonçalves, E. A. N. **20º Congresso Internacional de Odontologia**. São Paulo: Artes Médicas, 2002. v. 5, Cap. 14, p. 201-48.

SHEETS, A. R. et al. Identification and characterization of novel matrix-derived bioactive peptides: a role for collagenase from Santyl® ointment in postdebridement wound healing? **Plos One**, v. 11, n. 7, p. 1-22, jul. 2016.

SHIN, S. C.; KIM, J. Y. Enhanced permeation of triamcinolone acetonide through the buccal mucosa. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, n. 2, p. 217-20, sep. 2000.

SHINKAR, D. M.; DHAKE, A. S.; SETTY, C. M. Drug delivery from the oral cavity: a focus on mucoadhesive buccal drug delivery systems. **PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v. 66, n. 5, p. 466-500, sep./oct. 2012.

TAZIMA, M. F. G. S.; VICENTE, Y. A. M. V. A.; MORIYA, T. Biologia da ferida e cicatrização. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 41, n. 3, p. 259-264, 2008.

THRALL, M. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária** 1. ed. Roca: São Paulo, p. 335-54, 2007.

TOWNSEND JÚNIOR, C. M. et al. Tradução de Sabiston. **Tratado de cirurgia: a base biológica da prática cirúrgica moderna**. 19. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

YARED, K. F. G.; ZENOBIO, E. G.; PACHECO, W. A etiologia multifatorial da recessão periodontal. **Revista Dental Press**, Maringá – PR, v. 11, n. 6, p. 45-51, nov./dez. 2006.

URAZ, A.; et al. Comparative evaluation of platelet-rich fibrin membrane and connective tissue graft in the treatment of multiple adjacent recession defects: a clinical study. **Journal of Dental Sciences**, v. 10, n. 1, p. 36-45, mar. 2015.

VENTURIM, R. T. Z.; JOLY, J. C.; VENTURIM, L. R. Técnicas cirúrgicas de enxerto de tecido conjuntivo para o tratamento da recessão gengival. **RGO – Revista Gaúcha Odontologia**, Porto Alegre, v. 59, suplemento 0, p. 147-152, jan./jun., 2011.

WITTE, M. B.; BARBUL, A. General principles of wound healing. **Surgery Clinical North American**, v. 77, n. 3, p. 509-28, 1997.

ANEXO

ANEXO A- Parecer da comissão de ética no uso de animais.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação clínica e histológica do efeito cicatricial da pomada colagenase e da pomada colagenase e cloranfenicol sobre a ferida em mucosa do palato de ratos Wistar", registrada com o nº 31/2017, sob a responsabilidade de Noé Vital Ribeiro Júnior, que envolve a produção, manutenção ou 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 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-UNIFAL) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa científica
Vigência da autorização	De 07/08/2017 a 27/08/2018
Espécie/linhagem/raça	Rato <i>Wistar</i> / heterogênico
Nº de animais	60
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central da UNIFAL

Alfenas, 07 de Agosto de 2017.



Prof. Dr. Leonardo Augusto de Almeida
Coordenador CEUA – UNIFAL

CERTIFICATE

We hereby certify that the proposal entitled “Clinical evaluation and histological scar of ointment collagenase effect and chloramphenicol on injured in mucosa palate rats Wistar”, registration number 31/2017, under the responsibility of Noé Vital Ribeiro Júnior, which implies production, maintenance or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except humans), for the purpose of scientific research (or teaching), is in compliance with Law no. 11794, published on October 8th, 2008, with Decree no. 6899, published on July 15th, 2009, and with the guidelines issued by the National Council on the Control of Animal Experimentation (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA), and was approved by the Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA-UNIFAL) (Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Alfenas).

Purpose: () Teaching		(X) Scientific research
Expiration date	08/27/2018	
Species/strain/breed	Wistar rat / Outbred	
Number of animals	60	
Sex	Male	
Origin	Central Vivarium UNIFAL-MG	

Alfenas, August 07, 2017.



Leonardo Augusto de Almeida PhD

CEUA/UNIFAL Coordinator