

UNIVERSIDADE DE SANTO AMARO

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Rodrigo Autran

**AVALIAÇÃO DA REPARAÇÃO DA MUCOSA ORAL EM RATOS
APÓS SUSPENSÃO DA EXPOSIÇÃO À FUMAÇA DE CIGARRO.**

**SÃO PAULO
2006**

RODRIGO AUTRAN

**AVALIAÇÃO DA REPARAÇÃO DA MUCOSA ORAL EM RATOS APÓS
SUSPENSÃO DA EXPOSIÇÃO À FUMAÇA DE CIGARRO.**

Dissertação apresentada à Universidade de Santo Amaro, para obtenção do título de mestre, pelo programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de concentração em Implantodontia, sob a orientação do Prof. Dr. Paulo José Bordini.

**SÃO PAULO
2006**

B P012.0550
Class. U617.69
Cutter N928a
Patri nº 3869
Tipo entrada DOM
Nota Fiscal
Data rec. 21/12/2007
Preço
Origem Unisa F.C.C.
de Odontologia

**Ficha Catalográfica elaborada pela
Biblioteca Dr. Milton Soldani Afonso – Campus I**

A957a Autran, Rodrigo
Avaliação da reparação tecidual da mucosa oral em
ratos após suspensão da exposição à fumaça de tabaco
/ Rodrigo Autran. Orientação do Prof. Dr. Paulo José
Bordini. – São Paulo : 2006.
117p.

Dissertação (Mestrado). Área de Concentração em
Implantodontia. Universidade de Santo Amaro.

1. Mucosa oral 2. Tabagismo 3. Cicatrização tecidual
I. Título

RODRIGO PAIVA DE AUTRAN NUNES

Avaliação da reparação da mucosa oral em ratos após suspensão da exposição à fumaça de cigarro.

Dissertação apresentada à Universidade de Santo Amaro, para obtenção do título de mestre, pelo programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de concentração em Implantodontia, sob a orientação do Prof. Dr. Paulo José Bordini.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Paulo José Bordini

Professor Doutor pela Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Waldyr Antônio Jorge

Professor Doutor Livre docente pela Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Prof. Dr. Walter João Genovesi

Professor Doutor Livre docente pela Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

DEDICATÓRIA

Ao meu pai Dr. César Augusto de Autran Nunes meu eterno herói, meu guia à simplicidade, honestidade e vitória. A minha mãe Dra. Gilnar Paiva de Autran Nunes, minha colega de profissão, professora e amiga. A ambos pela presença ativa, carinho, amor, ensinamentos e tudo que me proporcionaram na vida, pois acredito que sem sua ajuda nada seria possível.

Aos meus irmãos Stella Paiva de Autran Nunes e Leonardo Paiva de Autran Nunes, por serem mais do que irmãos, por serem meus amigos, cúmplices e companheiros de todos os momentos, por me darem a mão e por me fazerem sentir necessário nos momentos que eles precisaram da minha mão.

À minha avó Gilnar Grillo Abdon Mariani Guerreiro pelo exemplo de juventude, coragem, serenidade e que me ensinou, com o sua vida e história, que não importa o tamanho do obstáculo, nada deve ser tão forte quanto a vontade de ser feliz.

A toda minha família pelo companheirismo, união e apoio que sempre tivemos uns com os outros.

Um agradecimento póstumo aos meus avôs, Dr. Almério de Paiva, Dr. Dário Mariani Guerreiro, Dr. Francisco Autran Nunes e avó Dionéia Castro Nunes que apesar de falecidos, é evidente sua presença através dos ensinamentos instituídos a mim.

Ao meu bisavô Dr. João Abdon Grillo, que apesar de não ter tido a oportunidade de conhecê-lo pessoalmente, me foi de exemplo profissional, patrono e primeiro presidente da ABO-RN, historicamente um exímio profissional e o quinto cirurgião dentista locado na minha cidade em Natal-RN.

Ao Prof. Dr. Wilson Roberto Sendyk, pela oportunidade, confiança, pelo incentivo ao nosso crescimento profissional e pessoal, pelo ensinamento adquirido nas aulas, clínicas, e no convívio pessoal.

Ao Prof. Dr. Paulo José Bordini pela sua rica orientação, por sua competência, dedicação e disponibilidade como orientador.

AGRADECIMENTOS

Aos docentes do Departamento de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia da UNISA, pela amizade e oportunidades oferecidas;

Aos estimados colegas mestrandos companheiros pela amizade, apoio e ajuda para execução dessa dissertação, em especial a Norma Terumi e Andréa Beder;

A todos os funcionários da Pós-graduação da Faculdade de Odontologia da UNISA pelo desprendimento e dedicação constante;

Aos colegas e professores da especialização em CTBMF no FUNDECTO-USP pelo incentivo e apoio tanto na especialização como junto ao mestrado;

Ao Prof. Dr. Waldyr Antônio Jorge, por ter me inspirado a lutar pelos meus ideais;

Aos Prof. Dr. Eduardo Gomes Seabra e Prof. Dra. Delane Maria Rego pelo incentivo, apoio e colaboração;

Aos pacientes presentes em todo meu processo de formação;

Ao UNITOX da UNISA que me auxiliou e amparou os animais utilizados nessa dissertação;

Ao biólogo Claudemir e técnico Cláudio, pelo cuidado extensivo junto aos animais e auxílio imprescindível na coleta de dados;

Aos histologistas: Prof. Dr. Guilherme Durante Cruz, Médico Veterinário, Prof. Anatomia Patológica, Anatomia Veterinária e Histologia Veterinária da Universidade de Santo Amaro – UNISA, Prof. Dr. Carlos Augusto Galvão Barboza, Cirurgião Dentista, Doutor em Patologia pela USP-SP, ao Colega Prof. Márcio Antônio Farias, Cirurgião Dentista, Mestre em Implantodontia e Professor no Departamento de Histologia da Faculdade de Odontologia da UNISA; Prof. Dra. Goretti Maria Freire de Carvalho, Médica, Professora em Patologia da UFRN do Rio Grande do Norte e UnP; Dr. Luciano Alexandre Ciqueira de Miranda Farmacêutico Bioquímico, assessor científico da ABBOTT Laboratórios,

Doutorando em Hepatite pela UNICAMP em Campinas –SP; pelo auxílio na análises das lâminas, pela disponibilidade e sugestões apresentadas;

Ao Prof. Eduardo Henrique Silveira de Araújo, professor no departamento de estatística da UFRN, pela orientação precisa na análise estatística;

A prof. Evânia Souza biblioteconomista na UFRN, pela revisão da estrutura dessa dissertação e sua adaptação às normas da faculdade de odontologia da UNISA;

RESUMO

Essa pesquisa teve como intuito avaliar a reparação do tecido mole oral em ratos após suspensão da indução o fumo, realizada com 32 ratos, gênero masculino, raça *Wistar*, com aproximadamente dois meses de idade, média de 350 gramas de peso cada, expostos a fumaça de cigarro que simulou um paciente fumante ativo. Divididos em dois grupos, um controle de ratos induzidos a 45 dias de exposição ao tabaco, imediatamente após a esse período foi provocado uma ferida cirúrgica em tecido mole de maxila e mantidos a exposição do tabaco até finalizar período do experimento. Um segundo grupo denominado de teste constituído de ratos que foram submetidos à exposição ao tabaco por 45, seguido de sete dias de abstinência, ocasião em que foi realizada ferida cirúrgica similar ao grupo controle. Nos terceiro, quinto, sétimo e décimo dia após a cirurgia foi realizado avaliações clínicas e biópsias, registrados por controle fotográfico. O material enviado para obtenção da análise histológica em duplo-cego, por quatro diferentes profissionais. Os resultados demonstram atraso na reparação em ambos os grupos, porém maior atraso na fase inflamatória do grupo controle. Na avaliação clínica não foram encontrados alterações significativas entre os grupos, sugerindo futuros experimentos com maior período de abstinência.

Palavras-Chaves: Mucosa bucal – Tabaco – Cicatrização tecidual – Tabagismo.

ABSTRACT

This research accomplished to evaluate the reparation of oral soft tissue in rats after abstinence period of smoke induced habit, realized on 32 males *Wistar* rats, average age of 2 months, and weighting around 350 grams each; they were exposed to tobacco smoke simulating an active smoker patient. Divided into two groups, a control which was induced to 45 days of tobacco smoke exposition, immediately after this period it was realized a surgical wound on maxilla soft tissue, then exposed them to tobacco smoke until the end of the experiment. The second group –test– constituted of 16 rats which were exposed to tobacco smoke for 45 days, followed to seven days of abstinence, occasion when it was realized a surgical wound similar to the control group. At the third, fifty, seventy and tenth day after surgery it was realized clinical evaluation and biopsies, recorded by photographic control. The collected material was sent to double-blind histological analysis, by four different specialists. The results demonstrated delay on the tissue repair of both groups, but the most delayed was noticed on the inflammatory phase of the control group. Clinical evaluation did not show significant alterations between groups, suggesting future studies utilizing longer period of abstinence.

Key words: Mouth mucosa – tobacco – wound – healing – smoking.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	P
Figura 1 Gaiola de armazenamento dos animais	48
Figura 2 Caixa Plástica de Indução de Fumo	48
Figura 3 Vista da divisória dos compartimentos de combustão e de inalação	49
Figura 4 Vista da gaveta com os cigarros instalados	49
Figura 5 a Caixa montada com a gaveta instalada.....	50
Figura 5 b Caixa montada com a gaveta instalada.....	50
Figura 6 a Cilindro de ar comprimido com regulador, mangueira e caixa	50
Figura 6 b Cilindro, fluxometro e regulador.....	50
Figura 7 Ratos na área de inalação.....	51
Figura 8 Vista dos ratos na abertura da caixa após a indução do fumo.....	51
Figura 9 Queima dos cigarros após o período de indução	52
Figura 10 Anestesia dos animais com Éter Sulfúrico	52
Figura 11 Perfurador esférico de 4 milímetros de diâmetros	53
Figura 12 Lesão inicial executada	53
Figura 13 Aspecto após incisão com lâmina esférica	54
Figura 14 Complementação da incisão.....	54
Figura 15 Aspecto da lesão inicial.....	55
Figura 16 Aspecto da formação de coagulo na lesão inicial.....	55
Figura 17 Aspecto do tecido retirado	56
Figura 18 Aspecto da lesão em cicatrização.....	56
Figura 19 Lâmina esférica utilizado-a para retirar a amostra para analise histológica.....	57
Figura 20 Retirada da amostra para analise Histológica.....	57
Figura 21 Retirada da amostra para analise Histológica.....	58
Figura 22 Aspecto após retirada de amostra.....	58

Figura 23	Amostra com aproximadamente 6 mm de diâmetro	59
Figura 24	Cicatrização tecidual no 3º dia do grupo controle	63
Figura 25	Cicatrização tecidual no 3º o dia do grupo teste	63
Figura 26	Cicatrização tecidual no 5º dia do grupo controle	64
Figura 27	Cicatrização tecidual no 5º dia do grupo teste	64
Figura 28	Cicatrização tecidual no 7º dia do grupo controle	65
Figura 29	Cicatrização tecidual no 7º dia do grupo teste	65
Figura 30	Cicatrização tecidual no 10º dia do grupo controle	66
Figura 31	Cicatrização tecidual no 10º dia do grupo teste	66
Figura 32	Cicatrização tecidual no 3º. dia do grupo teste, 400X, coloração HE.....	92
Figura 33	Cicatrização tecidual no 3º.dia do grupo controle, 400X, coloração HE	93
Figura 34	Cicatrização tecidual no 5º dia do grupo teste, 100X, coloração HE.....	93
Figura 35	Cicatrização tecidual no 5º dia do grupo controle, 400X, coloração HE	94
Figura 36	Cicatrização tecidual no 7º dia do grupo teste, 400X, coloração HE.....	94
Figura 37	Cicatrização tecidual no 7º dia do grupo controle, 400X, coloração HE	95
Figura 38	Cicatrização tecidual no 10º dia do grupo teste, 400X, coloração HE.....	95
Figura 39	Cicatrização tecidual no 10º dia do grupo controle, 400X, coloração HE	96

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Parâmetros de avaliação cicatricial.....	^p 46
Quadro 2	Graduação da avaliação cicatricial dos animais.....	61
Quadro 3	Tabela de frequência de resposta.....	62
Quadro 4	Análise da quantidade de neutrófilo	68
Quadro 5	Análise da quantidade de Edema.....	71
Quadro 6	Análise da quantidade de Macrófagos	74
Quadro 7	Análise da quantidade de Fibroplastia e níveis de Colágeno	76
Quadro 8	Análise da presença de Neovascularização.....	79
Quadro 9	Análise da presença de Miofibroblastos	82
Quadro 10	Análise da presença de reepitelização.....	84
Quadro 11	Análise de remodelamento e maturação	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Variações dos neutrófilos, em porcentagem	^P 69
Tabela 2 - Variações na presença de edema, em porcentagem	72
Tabela 3 - Variações na presença de macrófago, em porcentagem.....	75
Tabela 4 - Variações dos Fibroblastos e níveis de colágenos, em porcentagem	77
Tabela 5 - Variações da neovascularização e níveis de colágenos, em porcentagem.....	80
Tabela 6 - Variações da contração da ferida, em porcentagem.....	83
Tabela 7 - Variações dos reepitelização, em porcentagem	85
Tabela 8 - Variações do remodelamento e maturação, em porcentagem	87
Tabela 9- Resultado estatístico, comparação entre o grupo controle e teste	88
Tabela 10 - Resultado estatístico, comparação entre os grupos desconsiderando os dias de avaliações.....	89
Tabela 11 - Resultado estatístico, comparação da evolução do 3° ao 5° dia	90
Tabela 12 - Resultado estatístico, comparação da evolução do 5° ao 7° dia	91
Tabela 13 - Resultado estatístico, comparação da evolução do 7° ao 10° dia	91

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 Variação de neutrófilos, altas taxas	^p 69
Gráfico 2 Variação de neutrófilos, taxa moderada	69
Gráfico 3 Variação de neutrófilos,baixa taxa	70
Gráfico 4 Variação de presença de edema, alta taxa.....	72
Gráfico 5 Variação de presença de edema, taxa moderada.....	72
Gráfico 6 Variação de presença de edema, baixa taxa.....	73
Gráfico10 - Variações dos fibroblastos e colágeno, alta taxa	77
Gráfico11 - Variações dos fibroblastos e colágeno, taxa moderada	77
Gráfico12 - Variações dos fibroblastos e colágeno, baixa taxa	78
Gráfico13 - Variações na neovascularização, alta taxa.....	80
Gráfico14 - Variações na neovascularização, alta taxa.....	80
Gráfico15 - Variações na neovascularização, baixa taxa.....	81
Gráfico22 - Variações de remodelamento e maturação, altas taxa	87
Gráfico 23 - Variações de remodelamento e maturação, taxas moderada.....	87
Gráfico 24 - Variações de remodelamento e maturação, baixas taxas	88

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	p 15
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 O FUMO	17
2.2 O FUMO E O IMPLANTE	20
2.3 O FUMO E O PERIODONTO	24
2.4 O FUMO E A ATIVIDADE CICATRICIAL	31
3 PROPOSIÇÃO	40
4 MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1 MATERIAIS	41
4.1.1 Para medir o nível de carboxihemoglobina	41
4.1.2 Para inalação da fumaça do cigarro e avaliação da cicatrização	41
4.1.3 Drogas	42
4.1.4 Equipamentos	42
4.1.5 Material de Consumo	42
4.1.6 Instrumental	43
4.2 MÉTODOS	44
4.2.1 Os Animais	44
4.2.2 Experimento	44
5 RESULTADOS	60
5.1 COLETA DE DADOS	60
5.1.1 Análise Clínica da Regeneração	60
5.1.2 Análise Histológica da Regeneração	67
5.1.2.1 Fase Inflamatória	67
5.1.2.1.1 Presença de Neutrófilos	67
5.1.2.1.2 Presença de Edema	70
5.1.2.1.3 Presença de Macrófagos	73
5.1.2.2 Fase Fibroblática	75
5.1.2.2.1 Fibroblastia e níveis de colágeno	75
5.1.2.2.2 Neovascularização	78
5.1.2.2.3 Contração de ferida	81
5.1.2.2.4 Reepitelização	83
5.1.2.2.5 Remodelamento e maturação	85

6 DISCUSSÃO..... 97

6.1 DISCUSSÃO DA METODOLOGIA EMPREGADA 97

6.2 DISCUSSÃO DOS ACHADOS CLÍNICOS..... 98

6.3 DISCUSSÃO DOS ACHADOS HISTOLÓGICOS 99

7 CONCLUSÕES 106

REFERÊNCIAS

ANEXO A

ANEXO B

1 INTRODUÇÃO

O cigarro contém mais de 4.000 compostos tóxicos, alguns dos quais causam distúrbios cicatriciais. Nicotina, monóxido de carbono e cianeto de hidrogênio, combinados, reduzem a quantidade de oxigênio utilizável no processo de regeneração pós-cirúrgicas, como também outras substâncias requeridas. A suspensão do hábito de fumar tem sido sugerida nesses casos pelo fato de ser eficaz na redução de complicações cicatriciais em diferentes tipos de cirurgias (KURI *et al.*, 2005). No entanto a duração mínima do período de suspensão do fumo não foi bem estudada, e deve ser definida, para a obtenção de uma correta indicação pré-cirúrgica.

O tempo necessário para se reverterem os efeitos acima mencionados, após a suspensão do hábito de fumar, não tem sido devidamente estudado, exceto no que se refere à relação que existe entre a nicotina e a hipóxia tecidual (JENSEN *et al.*, 1991). Novas avaliações são necessárias para explicar como a suspensão desse hábito melhora a capacidade regenerativa de tecidos, além de examinar se menos de três semanas de suspensão pré-operatória do fumo pré-operatório é suficiente para a melhora do processo regenerativo (KURI *et al.*, 2005).

Em trabalho semelhante ao que nos inspirou na pós graduação, onde foi avaliado que os danos cicatriciais em mucosa oral de ratos *Wistar*, apresentaram atraso regenerativo na mucosa oral em todos os tipos de cirurgia realizados na região. Também foi visualizada interferência direta da ação dos fibroblastos, sem alteração da atividade de macrófagos. Saliente-se, ainda, que essas alterações clínicas e histológicas foram mais evidentes no início da regeneração, indicando que o retardo desse processo causado pelo hábito de fumar é mais evidente na fase inicial. (VITALE, 2005).

Esta pesquisa tem como objetivo instituir um possível protocolo do tempo necessário para suspensão do hábito de fumar cigarro para que se esteja seguro de quando é possível iniciar o ato cirúrgico sem preocupações quanto aos danos cicatriciais causados pelo fumo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O Fumo

O monóxido de carbono é o principal agente deletério na fase gasosa da fumaça do cigarro, Mosely; Finseth; Goody (1978) acreditam que um indivíduo não fumante apresenta aproximadamente um nível de 0,5 a 1% de carboxi-hemoglobina, em comparação ao um individuo fumante que pode apresentar taxa de 1% a 20%.

Sandhu (2001) proveu um protocolo detalhado que pode ser utilizado no consultório dentário como guia para o paciente na eliminação do hábito de fumar; qual consta das seguintes informações: 1) os componentes biofisiológicos, espirituais e sociais, como a atitude do indivíduo, são essenciais no auxílio da suspensão do fumo; 2) o elo entre estímulos ambientais e os efeitos de rápida ação prazerosa do ato de fumar tornam o tratamento muito difícil. Inicialmente o consultório deve ser declarado como um ambiente livre de cigarro; 3) é importante deixar disponível na sala de espera, literatura auto-explicativa sobre como fazer para cessar o hábito de fumar; 4) fotografias de pacientes antes e depois da suspensão do fumo devem ser também disponibilizadas pois são uma boa motivação; 5) a equipe de saúde deve treinar a forma de calibrar e padronizar as estratégias a serem adotadas; 6) no prontuário médico-odontológico deve ser documentado o tempo e a quantidade de cigarros utilizados pelo paciente (1-5 cigarros – consumo leve; mais de 10 cigarros – consumo moderado; mais de 20 cigarros – consumo severo). A estratégia da atuação do profissional depende do nível de dependência: 1) dependência leve: leve intervenção comportamental e terapia reposicional de nicotina; 2) dependência moderada: leve intervenção comportamental e

terapia reposicional de nicotina e farmacoterapia; 3) dependência severa: leve intervenção comportamental e terapia reposicional de nicotina, farmacoterapia e terapia comportamental intensiva. Os dentistas em geral não são capacitados na prescrição da medicação, portanto é aconselhável o paciente procurar um médico especializado. Neste caso o dentista deve limitar-se a intervenções sucintas ou a seções de aconselhamento. Usuários severos de tabaco, particularmente aqueles que apresentam morbidade clínica, como sinais ou sintomas de depressão e conflitos emocionais, precisarão de intervenção comportamental intensiva, com auxílio psicológico. Cerca de 3 a 4% dos pacientes conseguem parar de fumar sem auxílio profissional, e a terapia farmacológica pode auxiliar o tratamento, aumentando para 30% o sucesso em diferentes intervenções.

Campbell *et al.* (2001) acreditam nas fortes evidências dos malefícios do tabaco, na forma de cigarro. O cirurgião dentista deve incluir um serviço de tratamento para auxiliar o paciente a deixar o hábito de fumar, como parte do cuidado rotineiro de seus pacientes. O efeito do tabaco na cavidade oral aparece muito antes do que os efeitos sistêmicos e são visíveis e reversíveis com a de suspensão do hábito. Segundo os autores, os adolescentes e os homens procuram muito mais o consultório dentário do que os consultórios médicos, daí a importância de se apresentarem, de forma explícita, materiais auto-explicativos, na área de recepção do consultório, que funcionarão como provedor de fonte de informação para aqueles que desejam parar de fumar. Uma vez o fumante identificado, uma pergunta simples deve ser realizada – quanto ao interesse do paciente em parar de fumar – permitindo, assim, a intervenção do profissional. Para os fumantes não interessados em parar de fumar, uma oferta de ajuda para quando eles estiverem interessados não é abusiva e lembra que existe ajuda disponível. Na verdade, apenas uma pequena quantidade de fumantes pára de fumar simplesmente com a

intervenção profissional, porém o auxílio dos profissionais da área odontológica é essencial à orientação desse grupo de pacientes, provendo material educacional e auxiliando no plano de suspensão do hábito, ou oferecendo meios ao paciente para a suspensão do fumo, como também o conforto da equipe e programas de reabilitação.

Menezes *et al.* (2001) realizaram estudo transversal com alunos do primeiro ao quinto ano da Faculdade de Medicina Federal de Pelotas – 449 estudantes em 1996, 470 em 1991 e 426 em 1986. A ocorrência de tabagismo entre os estudantes era de 11,6%, porém passou a diminuir, nos três anos estudados, e o teste para tendência linear confirmou essa tendência ($p < 0,001$). Por outro lado, a queda percentual entre 1996 e 1991 foi menor do que observada entre 1991 e 1986 e não atingiu a significância estatística. Aproximadamente dois terços dos alunos afirmaram que o tabagismo, como tema de ensino, era pouco ou nada valorizado dentro do curso de Medicina; e 44% dos alunos responderam que o fumo entre os professores estimulava o vício de fumar nos estudantes. A dependência da nicotina é hoje reconhecida como uma doença, da mesma forma que a dependência a outras drogas, como a cocaína. Apesar da vontade de muitos fumantes abandonarem o vício, nem sempre isso é tarefa fácil, já que o organismo reage à diminuição do nível da nicotina com sintomas que variam de irritabilidade até insônia, entre outras manifestações mais severas. Para que se obtenha maior êxito nessa luta, é adequado, além do aconselhamento, utilizarem-se outras medidas, como a substituição por nicotina em forma de adesivo ou Bupropion. O alcance da cessação do fumo e de sua total erradicação não é uma tarefa individual: deve estar inserido em um contexto no qual cada um participe, dentro dos seus limites. A soma de esforços pode resultar na erradicação de uma das principais epidemias deste século.

Al-Shaammari *et al.* (2006) avaliaram um total de 1012 pacientes, em seis diferentes institutos de saúde no Kuwait, durante o mês de junho de 2003. Foram

identificados 297 pacientes fumantes, na maioria homens (93,3%), dos quais 52,2% apresentaram baixo índice de escolaridade. A maioria dos pacientes demonstrou conhecimento dos malefícios do hábito de fumar na saúde oral. A pigmentação dentária foi reconhecida por 89,5% dos pacientes, os efeitos periodontais por 76,2%, o câncer oral por 62,6%, danos regenerativo por 27,7%, e 50,8% responderam corretamente que a incidência de cárie não se relaciona ao hábito de fumar. A maioria dos pacientes fumantes (77,4%) relatou que poderia considerar a possibilidade de suspensão do hábito se fosse orientada quanto aos malefícios. O nível de conhecimento dos entrevistados quanto ao aumento da incidência de câncer oral nos fumantes apresentou-se baixo em relação às graves consequências ocasionadas pela doença. Na opinião dos autores, a orientação ao paciente pode auxiliar no fator decisão da suspensão do hábito de fumar. Outro ponto importante a ser relatado é que essa pesquisa foi realizada em uma única região, portanto esses dados podem não ser aplicáveis para outras localidades, tendo os autores sugerido outras avaliações, com diferentes amostras e em diferentes localidades geográficas.

2.2 O Fumo e o Implante

Jones e Triplett (1992) comentaram que a isquemia é um fator importante na fisiopatologia imposta na regeneração, pois o hábito de fumar cigarro tem efeito direto no tecido exposto, como também na redução da perfusão e distribuição do oxigênio no organismo. O experimento por eles realizado envolveu um grupo de quinze adultos, cinco deles fumantes e dez não-fumantes, todos os quais foram submetidos ao mesmo protocolo de enxertia óssea intra-oral simultânea à instalação de implantes. Cinco pacientes apresentaram perda no implante e/ou do enxerto. Destes quatro eram

fumantes (80% do grupo de fumantes), e um do grupo de não-fumantes (10%). Os autores consideram que o hábito de fumar possivelmente está associado com o problema da regeneração nessa série de pacientes. As evidências implicam, portanto, que o cigarro também é um fator de risco para implantes dentários.

Bain e Moy (1993) apresentaram uma revisão de 2.194 implantes do tipo Branemark instalados pelos autores em 540 pacientes e mantidos durante seis anos e sugeriam a avaliação da influência do hábito de fumar na falha de implantes. Foi perdido um total de 130 implantes (5,92%) e a porcentagem de perda em fumantes foi de 14,28%, em comparação a 4,76% em não-fumantes ($P < 0,001$). Com levantamento estatístico, foi sugerida a suspensão do uso do tabaco por pelo menos uma semana antes da cirurgia para permitir melhores níveis de adesão plaquetária e viscosidade sanguínea, assim como também a redução dos efeitos deletérios da nicotina, mantendo-se a suspensão por pelo menos dois meses após a instalação dos implantes, tempo de resposta regenerativa do osso envolvido e início da fase osteoblástica, quando o osso apresenta uma estabilidade inicial. Essa pesquisa identifica o hábito de fumar como um fator significativo para aumentar o potencial de perda de implantes dentários e recomenda futuros estudos para avaliar distintamente o mecanismo de atuação do tabaco e de um possível protocolo de suspensão do hábito de fumar, baseado em achados biológicos.

De Bruyn; Collaret (1994) realizaram uma pesquisa retrospectiva para descrever a sobrevida de implantes dentários instalados clinicamente e relacioná-la ao hábito de fumar dos pacientes. O artigo focou a falha encontrada entre o período de instalação e o período inicial de carga funcional em 462 implantes do tipo Branemark (Nobelpharma AB, Gotenburgo, Suécia), instalados em 117 pacientes, consecutivamente pelo mesmo cirurgião, sem distinção de idade, gênero, ou hábito de fumar. O hábito de fumar não

fumantes (80% do grupo de fumantes), e um do grupo de não-fumantes (10%). Os autores consideram que o hábito de fumar possivelmente está associado com o problema da regeneração nessa série de pacientes. As evidências implicam, portanto, que o cigarro também é um fator de risco para implantes dentários.

Bain e Moy (1993) apresentaram uma revisão de 2.194 implantes do tipo Branemark instalados pelos autores em 540 pacientes e mantidos durante seis anos e sugeriam a avaliação da influência do hábito de fumar na falha de implantes. Foi perdido um total de 130 implantes (5,92%) e a porcentagem de perda em fumantes foi de 14,28%, em comparação a 4,76% em não-fumantes ($P < 0,001$). Com levantamento estatístico, foi sugerida a suspensão do uso do tabaco por pelo menos uma semana antes da cirurgia para permitir melhores níveis de adesão plaquetária e viscosidade sanguínea, assim como também a redução dos efeitos deletérios da nicotina, mantendo-se a suspensão por pelo menos dois meses após a instalação dos implantes, tempo de resposta regenerativa do osso envolvido e início da fase osteoblástica, quando o osso apresenta uma estabilidade inicial. Essa pesquisa identifica o hábito de fumar como um fator significativo para aumentar o potencial de perda de implantes dentários e recomenda futuros estudos para avaliar distintamente o mecanismo de atuação do tabaco e de um possível protocolo de suspensão do hábito de fumar, baseado em achados biológicos.

De Bruyn; Collaret (1994) realizaram uma pesquisa retrospectiva para descrever a sobrevida de implantes dentários instalados clinicamente e relacioná-la ao hábito de fumar dos pacientes. O artigo focou a falha encontrada entre o período de instalação e o período inicial de carga funcional em 462 implantes do tipo Branemark (Nobelpharma AB, Gotenburgo, Suécia), instalados em 117 pacientes, consecutivamente pelo mesmo cirurgião, sem distinção de idade, gênero, ou hábito de fumar. O hábito de fumar não

apresentou efeito na porcentagem de falha na mandíbula, porém na maxila foi expressivo, pois 31% dos pacientes fumantes apresentaram falhas e apenas 4% dos não-fumantes. Apesar da pesquisa não ter avaliado outros riscos multifatoriais, o hábito de fumar demonstrou um importante efeito adverso na sobrevida inicial do implante antes da aplicação de carga, independente da qualidade ou quantidade óssea dos pacientes.

Riebel *et al.* (1995), para investigarem os efeitos negativos da nicotina, posicionaram e fixaram osso ilíaco enxertado em região disto-lateral do Fêmur de 24 coelhos neozelandeses maduros, divididos em dois grupos distintos: um grupo controle, em que foi instalada uma bomba osmótica para infusão de solução salina por duas semanas, e um grupo teste, em que foi infundida solução de nicotina. Foi encontrada nesse estudo, o atraso ou a inibição do crescimento da vascularização no osso enxertado, nos animais expostos a nicotina (20-45ng/ml). O efeito foi evidente na fase inicial de revascularização. Além disso, foi visível o atraso no crescimento da formação óssea dos animais expostos à nicotina, porém esse efeito foi reduzido ao aproximar-se a quarta semana, provavelmente relacionado suspensão da infusão de nicotina na segunda semana. Foi também evidenciada uma redução na reabsorção do osso tabecular por unidade de área de osso nos animais expostos a nicotina, indicando maior reabsorção óssea nos grupos mais tardios, relacionada à limitação da vascularização, e redução da habilidade de reabsorver tabéculas necróticas. O significado desses resultados pode ser transferido a efeitos ocasionados em fumantes humanos, portanto a descontinuidade de fumar é justificada antes da cirurgia de enxerto ósseo, e também foi relatado que a utilização de adesivos de nicotina pode atrapalhar a regeneração óssea.

Schwartz-Arad *et al.* (2002) compararam a incidência de complicações e a taxa de sobrevida de 959 implantes dentários em dois grupos de 89 pacientes fumantes e 172 pacientes não-fumantes, no período de 1995 a 1998. Os resultados dessa pesquisa

estabeleceram uma relação entre complicações em implantes e pacientes fumantes: estes apresentaram uma alta incidência de complicações. A maioria das complicações não evoluíram para perda dos implantes dentários. Os implantes imediatos falharam menos frequentemente que os não-imediatos e o índice de exposição foi maior nos implantes de hexágono externo do que nos de hexágono interno. Os autores acreditam que os pacientes deveriam ser orientados quanto à necessidade de limitarem ou reduzirem o hábito de fumar, pois, assim, poderiam reduzir os índices de complicações, possibilitando a maior sobrevida de seus implantes dentários.

Sendyk (2005) associa a experiência clínica com dados colhidos na revista de literatura e conclui que não há consenso na literatura de que o hábito de fumar aumente o número de fracassos de implantes colocados em área de quantidade óssea suficiente, não submetidas anteriormente a técnica de reconstrução, acreditar-se que pacientes fumantes tenham uma maior quantidade de reabsorção óssea na margem do osso alveolar perimplantar. Relata um número maior de fracassos em implantes colocados em enxertos ósseos e técnicas de levantamento de seio maxilar em paciente fumantes. Relata que fumo não é uma contra-indicação absoluta tanto para a colocação de implantes quanto para a realização de técnicas reconstrutivas. Todavia, deve-se levar em consideração que o tabagismo é um fator de risco adicional para a quantidade final do tratamento implantodôntico a ser realizado. O cirurgião-dentista, como profissional da área de Saúde, não pode se furtar à responsabilidade de motivar e, principalmente, alertar o paciente para os maléficos do tabagismo.

César-Neto *et al.* (2006) realizaram uma pesquisa com o intuito de investigar histologicamente, em ratos, a influência da inalação do cigarro e da suspensão da inalação, observando-se o suporte ósseo alveolar em volta de dentes clinicamente saudáveis. Os animais expostos ao hábito de fumar contínuo apresentaram uma

significante redução na proporção de tecido mineralizado, quando comparados aos animais dos grupos não fumante e ex-fumate ($p>0,005$), demonstrando o benefício da suspensão do hábito do fumo no significativo impacto do fumo de cigarro na qualidade óssea. Os resultados apresentaram, de forma linear, uma condição reversível provocada pelo consumo de cigarro, o que pode suportar a concepção clínica de que o efeito do consumo do cigarro em nível ósseo é reversível. Com os limites dessa pesquisa, os achados proveram uma evidência importante no efeito do hábito de fumar cigarro na região do osso alveolar circundante de dentes saudáveis, e reforçou a hipótese de que, tanto como em ossos esqueléticos, os ossos da cavidade oral podem ser influenciados danosamente pelo fumo. Por conta da anatomia e do metabolismo significativamente diferentes entre o rato e o humano, especialmente a respeito das idades cronológica e biológica, os autores sugerem comparações futuras dos resultados encontrados nessa pesquisa com dados coletados em grupos de pacientes humanos, devendo-se relacioná-los com cuidado.

2.3 O Fumo e o Periodonto

Hanes; Schuster; Lubas (1991) relataram que o efeito da nicotina sobre o fibroblasto tem alterado a morfologia deste e a adesão a substratos, como também tem causado distúrbios da síntese e secreção de proteínas. Essa alteração funcional pode estar associada com as mudanças na membrana celular, que resultam da adesão da nicotina, ou ao distúrbio de balanço do metabolismo celular, resultante de altos níveis de nicotina. A proposta dessa avaliação foi determinar se os fibroblastos gengivais aderem à nicotina e se algum tipo de adesão dessa natureza determinar a interação dos fibroblastos gengivais com a nicotina e se eles podem retornar a sua integridade. Os

resultados sugeriram que a nicotina adere ao fibroblasto gengival, que essa adesão é inespecífica e que a união dura um período médio de quatro horas, provendo alto índice intracelular. Os fibroblastos gengivais também devolvem a nicotina ao meio extracelular sem alterações metabólicas. Porém uma associação aparente da nicotina com componente intracelular aparenta desenvolver altos índices da nicotina no meio intracelular, o que pode interferir nas funções celulares normais.

Preber; Bergström; Linder (1992) propuseram uma pesquisa para relacionar a ocorrência das *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteróides gingivalis* e *Bacteróides intermedius* como patógenos originais da periodontite com o hábito de fumar. Não foi encontrada diferença significativa entre as culturas colhidas da bolsa periodontal dos pacientes fumantes e dos não-fumantes correlacionadas à presença de patógenos. Os autores apresentaram, com possível explicação para esse resultado, que a existência de patógenos desconhecidos poderia influenciar a patogenia da periodontite em pacientes fumantes. Porém a melhor explicação seria que o efeito do fumo pode modular a redução do mecanismo de defesa do hospedeiro. Os autores acreditam que o fumo pode tornar o tecido periodontal mais susceptível à ação destrutiva dos periopatógenos.

Stoltenberg *et al.* (1993) confrontaram a associação existente entre o hábito de fumar cigarros e sinais da doença periodontal. O exemplo da amostra consta de um total de 1.090 adultos saudáveis que foram atendidos pela organização de manutenção de saúde da área de St. Paul, no estado de Minneapolis, Estados Unidos. O estudo sugeriu que a severidade da doença periodontal é maior em fumantes do que em não-fumantes. Também foi reportado um maior índice de perda dentária no grupo dos pacientes fumantes, em comparação ao não-fumantes, no entanto não houve diferença estatística quanto à prevalência das *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *P.*

intermédia, *E. coredens*, ou *F. nucleatum* ($P>0,05$) nos dois grupos avaliados. Com os resultados dessa pesquisa, apresentou-se evidente que a presença de bactéria patogênica simplesmente não é suficiente para a ocorrência da atividade da doença periodontal, a interação de outras bactérias com o fumo associado a outros fatores não discutidos nesta pesquisa pode ter contribuído para obtenção destes resultados. Os autores acreditam que pesquisa futura envolvendo análise multivariável pode ser importante.

Ah *et al.* (1994) propuseram um trabalho para examinar o efeito do fumo na resposta clínica à terapia periodontal cirúrgica ou não-cirúrgica. Mudanças na medida da profundidade, no nível de adesão, na recessão gengival e na furca em molares, foram comparadas entre fumantes e não-fumantes em acompanhamento terapêutico, durante seis anos de preservação. Os pacientes não-fumantes demonstraram um melhora na medição da profundidade das bolsas durante todo o tratamento, em comparação ao grupo de fumantes, como também demonstraram melhora significativa no nível de adesão gengival, em comparação aos fumantes. Não foram encontradas diferenças significantes relacionadas ao nível de furca em ambos os grupos, porém os fumantes apresentaram piora do quadro de furca ao passar dos anos de preservação. Essa pesquisa registrou, através de avaliação clínica, que os pacientes fumantes não respondem tão bem ao tratamento periodontal como os não-fumantes e sugeriu investigação futura quanto à necessidade de identificarem as bases biológicas para esse achado.

Tipton e Dabbous (1995) propuseram, em um trabalho que realizaram, determinar o efeito da nicotina, como o principal componente do tabaco, na proliferação dos fibroblastos gengivais e na produção da fibronectina, como também na produção e quebra do colágeno do tipo I para, assim, explicar o papel do uso do tabaco na destruição periodontal. A nicotina, numa concentração maior que 0.075%, causou

morte celular, e a 0,075% e 0.05% causou vacuolização transitória nos fibroblastos; na concentração de 0.001% a 0,075% inibiu significativamente a proliferação dos fibroboastos. A produção da fibonectina e a de colágeno do tipo I foram significativamente inibidas pela nicotina, numa concentração de $\geq 0.05\%$, porém a concentração de $\geq 0,025\%$ aumentou significativamente a atividade da collagenase. O estudo sugere que a nicotina associada ao uso do fumo de cigarro resulta no incremento da destruição da matriz extracelular gengival, na presença de doença periodontal.

A nicotina e seu metabólito, a cotinina, têm sido encontradas na saliva e na gengiva, no fluido cervical dos fumantes com doenças periodontais. Estudos *in vitro* têm demonstrado que a inibição da nicotina provoca o crescimento dos fibroblastos gengival e o decréscimo da atividade da collagenase. Em adição, a inibição do neutrófilos e monócitos e função atimicrobiota têm sido reportados, após a exposição da nicotina. Nociti *et al.* (2000) investigaram, através de análise histométrica, o efeito da administração da nicotina relacionado à taxa de perda óssea, em região de furca, pela periodontite induzida. Vinte ratos *Wistar* foram submetidos a instalação de ligadura de algodão em posição submarginal, para indução de problema periodontal e a histometria realizada demonstrou sinais de inflamação gengival nos dentes ligados de todos os animais independente da infiltração de nicotina. Além disso, foi mantida a saúde periodontal dos molares do grupo controle, os quais não apresentaram diferença estatística, quando comparados com os dentes ligados do grupo de ratos submetidos a injeção de soro fisiológico. Porém os grupos que foram expostos à presença de nicotina apresentaram diferença significativa quanto à perda óssea na área de furca de molares, em comparação ao grupo não exposto. Os resultados desta investigação mostraram claramente que a presença de nicotina associada a infecção de placa dentária incrementa

a porcentagem de perda óssea periodontal. Porém de forma alguma a nicotina por si só causou perda óssea periodontal.

Mariggiò *et al.* (2001) avaliaram a apoptose de duas linhas fagocitárias de defesa orgânica: as células polimorfonucleares e as células mononucleares (os monócitos). Uma sutil exposição dos polimorfonucleares a cultura com nicotina graduada entre 0,01 e 0,3%, em dose dependente, reduziu o tempo de vida dessas células. Foi requerido um amplo tempo de cultura para que se observassem ao microscópio fluorescente traços morfológicos de apoptose, como a fragmentação do DNA na eletroforese a gel e a expressão da sinalização dos receptores da apoptose Faz/Apo-1. O efeito de apoptose relacionado à nicotina, na primeira linha de defesa humana contra a doença periodontal, pode ser um importante fator etiológico. O efeito da nicotina num período de 72 horas – “dose-dependente” – foi incapaz de causar efeito de apoptose na defesa de segunda linha das células mononucleares, os monócitos, porém a droga inibiu a liberação de IL-1 β , uma citocinase, também identificada como um fator de ativação osteoclástica. Foi também inibida a produção de um fator tecidual de ativação de protoagulação, um regulador do sistema coágulo-fibrinolítico do periodonto dentário. A nicotina pode ser deletéria na fase inflamatória, o que é determinado pela queda da função dos polimorfonucleares, porém a situação em que as células mononucleares se tornam predominantes no tecido inflamado devido à presença da nicotina poderia constituir-se num fator interessante para o balanço fisiológico, que demanda evolução e resolução de uma inflamação persistente encontrada na doença periodontal.

Alguns componentes do produto do tabaco, como é o caso da nicotina, podem contribuir para o desenvolvimento da periodontite, pelo efeito direto de sua toxicidade sobre a vitalidade celular, no sistema de defesa e na manutenção do hospedeiro. Chang *et al.* (2002) tiveram como proposta determinar os efeitos da nicotina, como um

a porcentagem de perda óssea periodontal. Porém de forma alguma a nicotina por si só causou perda óssea periodontal.

Mariggiò *et al.* (2001) avaliaram a apoptose de duas linhas fagocitárias de defesa orgânica: as células polimorfonucleares e as células mononucleares (os monócitos). Uma sutil exposição dos polimorfonucleares a cultura com nicotina graduada entre 0,01 e 0,3%, em dose dependente, reduziu o tempo de vida dessas células. Foi requerido um amplo tempo de cultura para que se observassem ao microscópio fluorescente traços morfológicos de apoptose, como a fragmentação do DNA na eletroforese a gel e a expressão da sinalização dos receptores da apoptose Faz/Apo-1. O efeito de apoptose relacionado à nicotina, na primeira linha de defesa humana contra a doença periodontal, pode ser um importante fator etiológico. O efeito da nicotina num período de 72 horas – “dose-dependente” – foi incapaz de causar efeito de apoptose na defesa de segunda linha das células mononucleares, os monócitos, porém a droga inibiu a liberação de IL-1 β , uma citocinase, também identificada como um fator de ativação osteoclástica. Foi também inibida a produção de um fator tecidual de ativação de protocoagulação, um regulador do sistema coágulo-fibrinolítico do periodonto dentário. A nicotina pode se deletéria na fase inflamatória, o que é determinado pela queda da função dos polimorfonucleares, porém a situação em que as células mononucleares se tornam predominantes no tecido inflamado devido à presença da nicotina poderia constituir-se num fator interessante para o balanço fisiológico, que demanda evolução e resolução de uma inflamação persistente encontrada na doença periodontal.

Alguns componentes do produto do tabaco, como é o caso da nicotina, podem contribuir para o desenvolvimento da periodontite, pelo efeito direto de sua toxicidade sobre a vitalidade celular, no sistema de defesa e na manutenção do hospedeiro. Chang *et al.* (2002) tiveram como proposta determinar os efeitos da nicotina, como um

componente do fumo, no crescimento, proliferação e síntese protéica dos fibroblastos periodontais de seres humanos, para esclarecer o mecanismo da destruição periodontal associado ao uso do fumo. A nicotina demonstrou um efeito de citotoxicidade nos fibroblastos do ligamento periodontal, reduzindo a atividade da desidrogenase das células após 24 horas de cultura. Nicotina à concentração $\geq 25\mu\text{M}$ inibiu o DNA na síntese dos fibroblastos ($P < 0,05$); na concentração de $50\mu\text{M}$ inibiu a síntese de DNA de 52%; elevando-se a concentração para $400\mu\text{M}$, a síntese de DNA foi completamente inibida. Três tipos de antioxidantes foram utilizados para se avaliar se poderiam proteger as células da toxicidade da nicotina. Foram utilizadas concentrações de superóxido dismutase ($10\text{-}100\text{ }\mu\text{g/mL}$), catalase ($5\text{-}50\text{ }\mu\text{g/mL}$) e ácido 2-oxotiazolidine-4-carboxicíclico (OTZ) ($0,5\text{-}10\text{ mM}$), substâncias não-tóxicas para os fibroblastos do ser humano. A única que demonstrou um resultado positivo foi a OTZ, quando elevada a 5mM , pois bloqueou quase completamente a nicotina. Porém a peroxi-hidrogenase (catalase) e a superóxido dismutase não apresentaram nenhum efeito de proteção. Também foi observado que o sulfoximino de butionino aumentou o nível de sobrevivência das células expostas a nicotina. Como a composição do tabaco é bem mais complexa e a nicotina é uma das mais de 2000 substâncias tóxicas do cigarro, há uma necessidade de aprofundamento do estudo das outras substâncias para avaliar seu papel na doença periodontal.

Haber *et al.* (2003), realizaram pesquisa com a finalidade de avaliar o hábito de fumar como fator de risco na periodontia. O levantamento examinava o risco de periodontite em pacientes diabéticos, dependentes ou não de insulina. Foram realizadas duas pesquisas independentes, nas quais foi avaliado o risco de periodontia associado ao fumo, em dois grupos distintos: um de pacientes portadores de diabetes *mellitus* (45%) e outro grupo, de pacientes não-portadores da diabetes (72). Os dados sugeriram que a

periodontite é mais severa nos pacientes fumantes, em comparação aos que nunca fumaram. Já na associação de pacientes portadores de diabetes com os saudáveis, não foi encontrada diferença significativa na presença de periodontite, sugerindo que a porção de casos com periodontite está associada ao hábito de fumar, não à condição de portador de diabetes *mellitus*. O efeito do fumo junto à prevalência de doença periodontal esteve diretamente relacionada como o grupo de pacientes jovens (entre 19 e 30 anos de idade), como também foi visualizado no grupo de pacientes mais idosos (entre 31 e 40 anos de idade). Portanto esse estudo revela uma associação marcante entre o hábito de fumar cigarros e o risco de doença periodontal em uma porcentagem marcante de jovens adultos, identificando os fumantes como um grupo de alto risco de incidência de periodontite e sugerindo que o cigarro é um importante fator de risco de doença periodontal.

Através da avaliação histológica, Benatti *et al.* (2005) observaram o impacto da inalação da fumaça do cigarro em ratos ou da administração de nicotina na capacidade de regeneração de periodontal da região de molar. A análise entre os grupos mostrou que o subgrupo exposto a fumaça de cigarro apresentava densidade óssea reduzida na região de neoformação óssea, em comparação ao grupo que foi submetido a infusão de nicotina. Não houve diferença estatística entre o grupo controle e o submetido a infusão de nicotina. Essa pesquisa demonstrou que a exposição a fumaça de cigarro afeta significativamente a regeneração óssea em fenestrações artificiais em osso mandibular de ratos. Porém injeções subcutâneas de nicotina não apresentaram diferença na regeneração. Os resultados indicam que o hábito de fumar cigarro pode reduzir a capacidade de regeneração do processo alveolar, independente da presença do biofilme.

Güntsch *et al.* (2006) averiguaram a função dos neutrófilos polimorfo nucleares em placa de fumantes e não-fumantes de periodonto saudável. Foi recrutado um total

de 60 estudantes da Universidade de Jena (EUA), que foram divididos em quatro grupos: 15 estudantes não-fumantes; 15 fumantes leves (< 5 cigarros/dia); 15 moderados (5-15 cigarros/dia); e 15 de fumantes severos (> 15 cigarros/dia). Os dados desta pesquisa sugerem que o hábito de fumar impede a viabilidade e a função normal dos neutrófilos polimorfo nucleares. Foi encontrado um maior número de neutrófilos polimorfo nucleares em região cervical dos dentes nos subgrupos de fumantes leves e moderados porém, houve uma redução da sua viabilidade e função; já o grupo de fumantes severo apresentou uma redução do número, viabilidade e função dos neutrófilos polimorfo nucleares, em comparação ao grupo controle. A redução da capacidade fagocitária deve estar relacionada à redução da capacidade de adesão. Portanto é previsível que esses subgrupos de jovens fumantes, que atualmente não apresentam doença periodontal, possam apresentar problemas periodontais no futuro, relacionados ao hábito de fumar cigarro.

2.4 O Fumo e a Atividade Regenerativa

Através da coleta sanguínea em humanos, Neher (1974) realizou cultura de linfócitos, em uma tentativa de avaliar o crescimento dos linfócitos. Os pesquisadores relatam que mesmo pequenas quantidades de nicotina, como a concentração de 0,004- $\mu\text{g/ml}$, apresentam efeito adverso no crescimento de linfócitos em vivo. No estudo, a concentração de nicotina 610 $\mu\text{g/ml}$ inibiu por completo o crescimento dos linfócitos periféricos e reduziu até 40% o número de células vivas, nos três dias de cultura. Os linfócitos se apresentaram mais susceptíveis ao efeito da nicotina do que as outras células presentes na cultura.

Em uma tentativa de comprovar os malefícios do tabaco no hábito de fumar Mosely; Finseth; Goody(1978) propuseram uma avaliação regenerativa das orelhas de 20 coelhos. A nicotina retardou o processo regenerativo de seis para dez dias no grupo teste, porém a regeneração tecidual teve continuidade similar em ambos os grupos após doze dias até o fim da avaliação de 21 dias. Essa pesquisa sugere que o hábito de fumar cigarro, associado à absorção de nicotina, é um hábito danoso que retarda o período de regeneração tecidual.

Relacionando o hábito de fumar e osteítes Sweet e Butler (1979), constataram alterações vasculares resultantes do tabagismo, com conseqüente aumento na incidência de alvolite, após exodontias, num estudo que incluía 200 pacientes dos quais foram realizado 400 exodontias de terceiros molares em mandíbula. Os autores apontaram vários mecanismos patogênicos, resultantes do efeito, de produtos do cigarro – especialmente a nicotina e o monóxido de carbono–, interferindo na agregação plaquetária, formação do trombo e resistência do coágulo. Fragilizando a permeabilidade vascular e, e retardando a regeneração tecidual.

Reuz *et al.* (1984) procuraram quantificar o fluxo sanguíneo com auxílio da visualização direta das arteríolas das orelhas de ratos vivos através do auxílio de microscópio comum. O efeito inicial do tabaco produziu um aumento transitório da pressão arterial do rato, e a micro-circulação apresentou uma vasoconstrição periférica da orelha do animal. O diâmetro interno dos vasos decresceu para 92,9%, em comparação aos níveis anteriores ao fumo e gradualmente retornou à linha basal. Foi observada uma pequena redução da velocidade das células vermelhas – um decréscimo de 12% - após o fumo. A vasoconstrição retornam a sua normalidade depois de aproximadamente dez minutos. Essa pesquisa constitui-se numa base para a advertência contra o fumo no período pós-operatório em pacientes submetidos a cirurgias a retalho.

Lawrence *et al.* (1984) construíram uma caixa para possibilitar a exposição de uma amostra de ratos ao fumo de cigarros. Utilizaram dois compartimentos de vidro interconectados por uma abertura de três centímetros. A parte inferior serviu para a realização da combustão dos cigarros: existia uma abertura na câmara superior para possibilitar a circulação do ar e, assim, manter a qualidade do ar como proveu a circulação da fumaça dentro do compartimento superior onde estavam posicionados os ratos. Os ratos foram expostos a 25 cigarros ao dia. Os níveis sanguíneos foram obtidos com auxílio da avaliação dos níveis de carboxi-hemoglobina no sangue da amostra, que variavam entre 16,2% e 8,4% no grupo dos ratos fumantes, e 0% a 2% no grupo controle não-exposto ao fumo. O nível de carboxi-hemoglobina nos ratos era compatível com fumantes humanos. Os ratos demonstravam fobia à exposição à fumaça do cigarro do início ao término da pesquisa. Os pesquisadores relataram que a sobrevida do retalho realizado no dorso dos ratos da amostra foi comprometida pela exposição ao cigarro, retardando, assim, a regeneração tecidual. O mecanismo específico do atraso na regeneração tecidual do grupo exposto ao tabaco não pode ser comprovado através desse modelo de pesquisa, portanto foi sugerido um futuro estudo para avaliar o mecanismo do retardo da regeneração tecidual relacionado ao hábito de fumar.

Através de pesquisa, Siana; Rex; Gottrup *et al.* (1989) avaliaram a regeneração tecidual em um grupo de 120 mulheres que foram submetidas ao procedimento de esterilização através de laparotomia. A regeneração de 75% das pacientes fumantes foi considerada satisfatória, em comparação a 100% de regeneração das não-fumantes. Na pesquisa, foi demonstrado que as cicatrizes das pacientes fumantes apresentaram coloração mais escura e ampla, em comparação às das não-fumantes. Não foram

encontradas evidências de correlação do efeito do fumo na formação do colágeno, por isso foram sugeridos estudos futuros quanto a possíveis alterações do colágeno.

Sherwin e Gastwirth (1990) através de uma revisão de literatura avaliaram os efeitos deletérios do fumo em forma de cigarro e seus constituintes fisiológicos. A nicotina, monóxido de carbono, e os principais componentes do cigarro apresentaram influência quanto à inibição do reparo na epitelização, causando danos nos componentes celulares sanguíneos, e criando uma hipóxia celular. Portanto sugerem recomendações quanto à necessidade da suspensão do hábito de fumar antes de procedimentos cirúrgicos.

Jessen *et al.* (1991) demonstram a redução rápida e significativa do oxigênio nos tecidos subcutâneos em oito voluntários, em resposta ao fumo, e permaneceu baixa durante de 30 a 50 minutos. Esses dados sugerem que fumar um maço de cigarros por dia, podem levar a hipóxia tecidual por um período significativo. O grau de hipóxia encontrado esta associado a pobre capacidade regenerativa em diferentes estudos realizados com animais e humanos. A hipóxia tecidual pode está relacionada aos efeitos farmacocinético da nicotina encontrada na circulação sanguínea. Isto sugerem que a vasoconstrição periférica é induzido pelo efeito adrenérgico da nicotina e que pode contribuir ao decréscimo do oxigênio nos tecidos subcutâneos.

O mecanismo da associação do fumo com envelhecimento facial e regeneração tecidual aberrante não é bem compreendido. Para comparar a regeneração tecidual na síntese de colágeno em vivo e a degradação da pele Knuutinen *et al.* (2002) avaliaram 47 fumantes e 51 não-fumantes do norte de Finlândia. Apresentaram síntese dos colágenos dos tipos I e III decrescido e o mecanismo de manutenção e balanço da matriz extracelular que também foi afetado constituíram nova informação sobre o mecanismo de envelhecimento facial prematuro e regeneração tecidual irregular em

fumatnes. O impacto observado, de 18-22% do decréscimo na síntese do colágeno, no mecanismo de resistência e estabilidade da pele, não é esclarecido, porém fumantes severos têm mostrado sofrimento tecidual por hipóxia durante a maior parte do dia, e esse longo período de hipóxia e toxicidade os afeta e pode explicar a alteração no balanço da matriz extracelular, a queda da síntese do colágeno e o incremento dos níveis de Matriz de metaloprotease na pele de fumantes podem levar à deterioração em longo prazo.

Wong *et al.* (2004) documentam e avaliam o prejuízo causado em fumantes passivos, que são mais expostos a um maior número de componentes, em maior concentração, que os fumantes ativos. A exposição ao tabaco reduziu a capacidade reprodutiva dos fibroblastos, portanto os resultados sugerem um aumento da sobrevida celular relacionado a pobre replicação. Foi encontrada uma redução na capacidade adesiva dos fibroblastos, ocasionando um decréscimo na migração celular, em comparação às células encontradas em tecidos em vivo. O sistema endomenbranoso é interconectado por microtúbulos, que eram de difícil distinção nas células expostas ao fumo, sugerindo sua desorganização. Durante o processo de granulação tecidual, é necessário que o fibroblasto migre para a área de regeneração, para que possa efetuar suas diferentes funções; portanto, se a migração é inibida, a granulação e a formação tecidual são prejudicadas, resultando em um atraso ou deficiência da regeneração tecidual. Cobaías expostas ao fumo obtiveram 85% de tecido cicatrizado, em comparação a 95% do grupo de cobaías não expostas ao fumo, demonstrando que a regeneração tecidual pode ser significativamente atrasada. Na avaliação microscópica, as cobaías expostas ao fumo demonstraram celularidade e deposição de matriz anormais. Fumantes passivos estimulam as proteínas que prolongam a sobrevida celular dos fibroblastos e inibem sua migração. Esse processo pode resultar no atraso

do reparo e remodelamento, levando a uma cicatriz indesejada, como é comum em indivíduos fumantes. Portanto é importante o conhecimento dessa intoxicação nos indivíduos expostos ao fumo passivo, pois essa exposição pode ser bastante perigosa.

Assis *et al.* (2005) investigaram em ratos expostos ao fumo de cigarro a presença de bel-2 e bax são dois genes efetuais importantes durante o processo intrínseco de apoptose celular. A prot-oncogênese bet-2 que tem o papel de inibir a apoptose celular; já o bax é considerado o maior efetor da apoptose celular. Portanto a relação bel-2//bax controla a relativa susceptibilidade de estimular a célula induzindo a apoptose e a morte celular. A apoptose é um mecanismo de defesa importante para prevenir e eliminar as células cancerígenas, e sua desregulação pode ocasionar o desenvolvimento e o crescimento de tumores cancerígenos. Com o intuito de avaliar proliferação celular, na mesma amostra também foi avaliada a positividade para antígeno nuclear da célula na sua proliferação desta. A avaliação microscópica apresentou infiltração de neutrófilos em mucosa da laringe no grupo exposto ao fumo. Foi observada transformação hiperplásica e metaplásica em alguns dos espécimes submetidos ao fumo. A porcentagem de bel-2/bax apresentou um aumento após 75 dias de exposição ao fumo, em comparação ao grupo-controle; já o antígeno nuclear da célula na sua proliferação não apresentou diferença estatística entre os dois grupos. Portanto o mecanismo pelo qual o fumo induz a carcinogênese oral não pode ser relacionado a proliferação celular no tecido avaliado. Os pesquisadores concluíram que bel-2 apresentou-se mais expressado após a exposição ao fumo de cigarro, mas que são necessárias outras pesquisas para analisar o mecanismo de indução e possibilitar uma compreensão da extrapolação deletéria do fumo.

A migração celular é a chave para o processo de regeneração e é regulada por uma variedade de sinalizadores. Fang e Svoboda (2005) examinaram alguns possíveis

sinalizadores necessários para a migração dos fibroblastos, em uma tentativa de confirmar que a nicotina tem um efeito deletério na atividade celular regenerativa de tecidos, avaliando se a nicotina causa algum distúrbio na pequena proteína G, e Rac necessárias para a realização da migração celular, e no sinal para cadeia de proteínas, como 1/2 quinase p21-ativada(PAK^{1/2}), e proteína ativadora de mitogênese erk1(Pp44/42 MAPK). O intuito dessa experiência foi observar, num período de dois dias seguidos, a regeneração de um área ferida. As amostras tratadas em nicotina apresentaram metade da porcentagem de crescimento, durante todo o período de avaliação, em comparação com as células do controle. Em relação à polaridade celular, os autores concluíram que a nicotina não mudou a habilidade e o senso de direção na migração celular regenerativa, sob condições experimentais. Os autores observaram que a nicotina reduziu a atividade da Rac, porém aumentou a atividade da PAK^{1/2} e erk^{1/2} (P-p44/42 MAPK), levando a acreditar que outro sinalizador poderia estar aumentando a atividade da PAK^{1/2} que provavelmente não estava relacionada à atividade reduzida da Rac, sob as condições do experimento. Portanto outros sinalizadores poderiam estar envolvidos na migração celular, como uma proteína membro da família MAPK, Mek (proteoquinase, quinase ativada mitogenicamente), que é detectada através de um sinalizador erk^{1/2}. Interessantemente, no grupo tratado com nicotina a atividade da erk^{1/2} foi mais intensa que no grupo-controle. O estudo demonstrou que os fibroblastos, na presença de nicotina, reduziram até 50% sua migração e que a atividade da proteína Rac decresceu. Independente dessa redução, a PAK^{1/2} e a erk ^{1/2} mantiveram-se ativas. Esses sinais indicativos podem ser importantes na modulação e reguladores do processo de regeneração de ferimentos orais em pacientes que fumam.

Kuri *et al.* (2005) apresentaram como proposta obter valores relativos à melhor época para se realizar a suspensão do hábito de fumar que proporcione a redução da incidência de complicações na regeneração em cirurgias reconstrutivas de cabeça e pescoço, pois entendiam que um período curto pré-determinado de suspensão do fumo antes da cirurgia resultasse em melhora da regeneração, o que poderia funcionar também como uma boa recomendação, que de encorajaria os pacientes a deixarem o fumo. A incidência de dano regenerativo foi baixa em ex-fumantes intermediários (de 8 a 42 dias) e iniciais (7 dias), o que não significou diferença substancial em comparação ao grupo que havia parado de fumar há mais tempo (>43 dias). Os autores apresentaram uma correlação significativa entre a melhora na suspensão do hábito de fumar e o grau de regeneração tecidual. Ex-fumantes intermediários e recentes e não-fumantes tiveram um significativo baixo risco de desenvolver complicação na regeneração tecidual, em comparação ao grupo de fumantes. A porcentagem de cigarros consumidos não teve significância na relação entre a suspensão do fumo e a regeneração tecidual. O risco de complicações começou a apresentar redução nos grupos que pararam de fumar de uma a quatro semanas antes da cirurgia, decaindo os riscos naqueles que haviam parado há mais tempo. Essa orientação deve ser disseminada junto aos profissionais de saúde e na orientação de pacientes que serão submetidos a cirurgia em cabeça e pescoço.

Vitale (2005) utilizando a mesma metodologia instituída nessa pesquisa, teve como objetivo avaliar e comparar – em ratos induzidos ao fumo e ratos não-induzidos ao fumo – a interferência da fumaça de cigarro na regeneração da mucosa oral. Os resultados histológicos e clínicos concluíram que, comparando-se ratos do grupo experimental com ratos do grupo controle, houve um retardo na regeneração dos tecidos

moles bucais dos animais do primeiro grupo – expostos a fumaça de cigarro –, de onde se deduziu que o hábito de fumar cigarro é prejudicial à reparação tecidual.

3 PROPOSIÇÃO

A intenção deste trabalho foi comparar clínica e histologicamente, a reparação da mucosa oral em maxila de ratos *Wistar*, após exposição à fumaça de cigarro seguida de um período de abstinência, em relação a outro grupo igualmente exposto a fumaça de cigarro, porém sem suspensão do hábito.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Para manutenção dos animais

- Ração¹;
- Água filtrada;
- gorro, máscara, e luva de procedimento²;

4.1.2 Para inalação da fumaça do cigarro e avaliação da regeneração

- caixa plástica³ para simular em ratos o hábito de fumar;
- cilindro de ar comprimido com regulador e fluxômetro⁴;
- mangueira de silicone ligando cilindro-caixa;
- cigarros da marca Hollywood⁵;
- caneta – marcador permanente;
- pinça clínica reta e pinça Adson com dente de rato;
- cabo de bisturi n° 3;
- perfurador esférico de 4 e 6 mm;
- tesoura reta serrilhada;
- lâmina de bisturi n°15⁶;
- gaze estéril⁷;

¹ Purina (SP, Brasil).

² Sanremo, Esteio - RS – Brasil.

⁴ White Martins, Osasco – Brasil.

⁵ Souza Cruz - Brasil

⁶ Two Arrows, Shanghai med S.N., Shanghai - China.

⁷ Neve ind. e com. lida., São Paulo - Brasil.

- máquina fotográfica digital Sony (DSV-V1)⁸.

4.1.3 Drogas

- clorexidina⁹;
- eter;
- solução de amônia¹⁰;
- água destilada¹¹;
- formalina;
- hematoxilina.

4.1.4 - Equipamentos

- caixa de plástico¹²;
- cilindro de ar comprimido com regulador e fluxômetro¹³;
- mangueira de ar comprimido (silicone).

4.1.5- Material de consumo

- luvas estéreis¹⁴;
- máscaras;
- gorros;
- óculos de proteção;
- gases estéreis;

⁸ Sony Cyber-shot 5.0megapixels – DSC-V1 – China

¹⁰ Colgate-Palmolive, S. Bernardo do Campo - Brasil

¹¹ Paulínia, São Paulo – Brasil.

¹⁰ Rioquímica, São José do Rio Preto, Brasil.

¹² UNISA, São Paulo – Brasil.

¹³ Plástico Santana 25litros.

¹³ White martins.

¹⁴ Madeitex, S. José dos Campos - Brasil.

³ Satari, Songkhla - Thailand.

4.1.6 – Instrumental

- afastador;
- pinça;
- cabo e bisturi circular (*perfurador esférico* 4 e 6mm);

4.2 Métodos

4.2.1 Os animais

Foram utilizados 32 ratos, do gênero masculino, da raça *Wistar*, com média de quatro meses de idade e aproximadamente 250 miligramas de peso. Os animais foram adquiridos pelo pesquisador e levados ao biotério da Universidade de Santo Amaro, onde passaram por um período de adaptação de 15 dias. Mantidos em gaiolas, sob controle condicional de temperatura ($24 \pm 2^\circ$), período de claridade e escuridão de 12 horas, acesso livre a água filtrada e ração *ad libitum*, sob supervisão veterinária até o final do estudo (figura 1).

4.2.2 Experimento

O experimento descrito a seguir foi registrado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Santo Amaro número 282/05, recebeu o parecer da comissão ética número 141/2005, experimento esse que atende aos aspectos fundamentais das Resoluções do Conselho Nacional de Saúde 196/96, 251/97 e 292/99, sobre Diretrizes e Normas Reulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Vivos (Anexo A).

Os animais divididos em dois grupos distintos, ambos foram retirados duas vezes ao dia da gaiola e foram expostos ao fumo de cigarro por 45 dias seguidos, totalizando aproximadamente 3.120 cigarros. De acordo com o fabricante, cada cigarro utilizado no experimento libera 10mg de alcatrão, 0,8 mg de nicotina e 10mg de monóxido de carbono.

O método utilizado na presente pesquisa foi similar ao proposto por Simani, Inoue; Hogg (1974) e implementado por Wang *et al.* (1999) para que houvesse a exposição dos animais ao fumo de cigarro em uma incubadora de plástico modificada

(figuras 2, 3 e 5), com uma câmara limpa acoplada a um cilindro de 9,6 m³ (figuras 6a e 6b) composto de ar comprimido, ar medicinal com as mesmas características do ar atmosférico, obtido através da mistura do oxigênio com nitrogênio, na proporção de 21% O₂ e 79 % N₂, com grau de pureza mínima de 99,5%. O ar medicinal foi utilizado para se realizarem as tragadas de fumaça através do vácuo soprado para dentro do recipiente onde estavam os ratos (figuras 4, 7, 8 e 9). Aproximadamente um cigarro por rato, em um tempo médio de dez minutos, aplicado com intervalos de doze horas, inserido inicialmente de forma gradual até totalizar dois cigarros por rato na segunda semana, em tempo médio de vinte minutos/dia. O protocolo utilizado nessa pesquisa com auxílio de uma caixa em que os ratos foram expostos à fumaça e do número de cigarros por dia foi sugerido por Nociti *et al.* (2002) e Vitale (2005).

Imediatamente após o período de exposição de tabaco o grupo um denominado de grupo controle, foi submetido a anestesia, antissepsia intra-oral e extra-oral (figura 10), e nele foi realizada a cirurgia com auxílio de um perfurador esférico (figura 11), causando um ferimento de aproximadamente quatro milímetros na região da mucosa maxilar (figuras 12, 13, 14, 15, 16 e 17). Após a obtenção da ferida cirúrgica, os animais continuaram o processo de inalação de fumaça de cigarro até o último dia do experimento sendo retirados de suas gaiolas duas vezes ao dia e postos na câmara adaptada. Durante os dez dias de regeneração foram coletadas amostras para avaliação da mesma forma que no grupo teste como será descrito a seguir.

No segundo grupo, após o período de 45 dias de inalação de fumaça, o tabaco foi suspenso por um período de sete dias – equivalente a um mês em seres humanos – tempo aproximado ao necessário para a realização do ciclo regenerativo de tecidos moles, e os ratos foram assim mantidos em suas devidas gaiolas, onde desfrutaram de ar puro, ração e água. Após o período de sete dias sem fumar, foram submetidos a um

ferimento cirúrgico com auxílio de um perfurador esférico com aproximadamente 4 mm na região da mucosa maxilar similar ao realizado no grupo controle.

Na avaliação e comparação regenerativa de todos 32 ratos quanto o procedimento de coleta de dados, os dois grupos foram divididos em sub-grupos eqüitativos, e realizada coleta de tecido em regeneração nas diferentes datas de três, cinco, sete e dez dias após a cirurgia. Antes da coleta os animais foram anestesiados, realizados sacrifício pelo método do deslocamento cervical, para evitar sofrimento, analisado clinicamente e graduado o processo de reparação quanto a presença de infecção, alteração na coloração, contração do perímetro e presença de edema com mostra o quadro a baixo:

Quadro 1 – Parâmetros de avaliação regenerativo.

<u>Regeneração</u>	<u>Graduação</u>
	1- Ausência de infecção. +
Boa	2- Perímetro menor que 4 mm. +
	3- Ausência de edema +
Moderada	4- Coloração normal +
++ - -	1- Presença de infecção -
	2- Perímetro maior que 4 mm -
Ruim	3- Presença de edema -
	4- Presença de eritema -

Esses dados foram avaliados por uma análise estatística que teve como objetivo verificar a consistência dos dados obtidos na avaliação clínica dos parâmetros estudados, recorreu-se ao teste qui-quadrado e ao teste de proporcionalidade, todos em nível de 95% de confiança ($p \leq 0,05$).

Após a avaliação clínica foram realizadas fotografias para registro e então coletado material para avaliação histológica. A coleta foi realizada com auxílio de um perfurador esférico de 6mm de diâmetro (figuras 19, 20, 21, 22 e 23), que possibilitou a

retirada de amostra com um diâmetro maior com a inclusão de tecido sadio circundante, para auxiliar nos parâmetros de localização na avaliação histológica (figuras 21, 22 e 23). Os fragmentos removidos (figura 23), fixados em formal 10% por um período de três dias, passaram por um processo de inclusão em parafina, para só então, tornar-se possível o corte com o micrótomo. Lâminas obtida da mesma região do bloco, processado e corada um vez, totalizando o número de 31 lâminas avaliadas por quatro diferentes profissionais calibrados nos seguintes parâmetros de avaliação histológica das lâminas nos dias 3, 5, 7 e 10 em duplo-cego entre o grupo controle e teste, utilizando um escala de cruz onde eram graduados de acordo com a quantidade de células ao microscópio óptico encontrados em cada lâmina em pouco*, moderado** e alto***, como demonstrado a baixo:

- + Muito pouco - dependendo da idade da ferida*
- ++ Pouco - dependendo da idade da ferida*
- +++ Moderado - dependendo da idade da ferida**
- ++++ Alto - dependendo da idade da ferida***
- +++++ Muito Alto - dependendo da idade da ferida***

Resultando em tabelas numa tentativa de graduar a quantidade de neutrofilos, presença de edema, presença de macrófagos, fibroplastia e níveis de colágenos, neovascularização, presença miofibroblastos, reepitelização e maturação celular. Esses dados foram avaliados por uma análise estatística em testes não paramétricos que teve como objetivo verificar a consistência dos dados obtidos na avaliação histológica dos parâmetros estudados. Na avaliação histológica recorreu-se a Teste de *Mann-Whitney U*, o teste foi usado para comparar duas amostras independentes de unidades amostrais, e o teste de *Kruskal wallis* –não paramétrico– utilizado para comparar duas amostras independentes dos animais, e *Wileoxon* utilizado para possibilitar a comparação entre os grupos da evolução e reparação tecidual através das lâminas histológica nos diferentes períodos de tempo.



Figura 1 – Gaiola de armazenamento dos animais, com ração e água filtrada *ad libitum*.



Figura 2 – Caixa Plástica de Indução de Fumo.



Figura 3 – Vista da divisória dos compartimentos de combustão e de inalação.



Figura 4 – Vista da gaveta com os cigarros instalados.

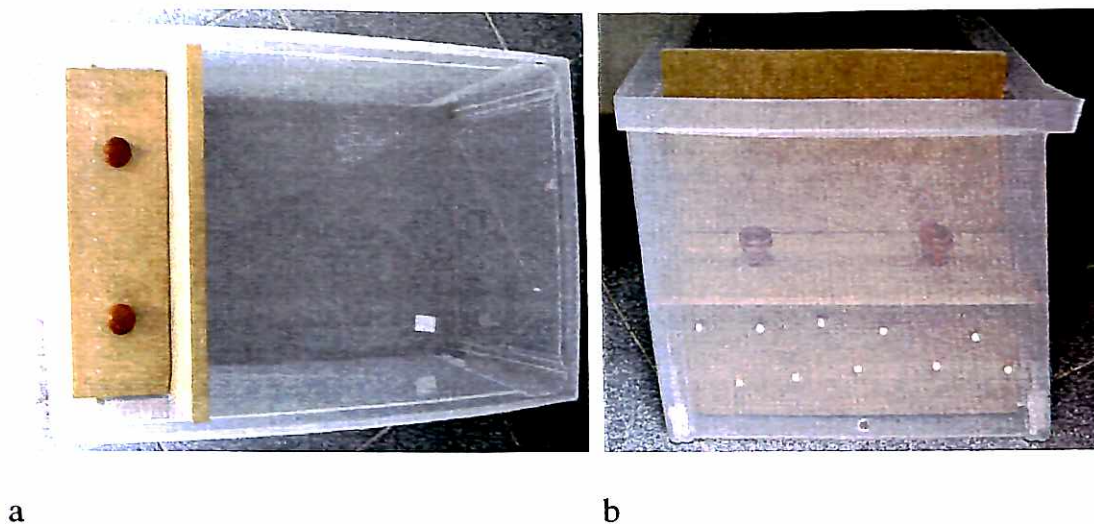


Figura 5 (a, b) – Caixa montada com a gaveta instalada.

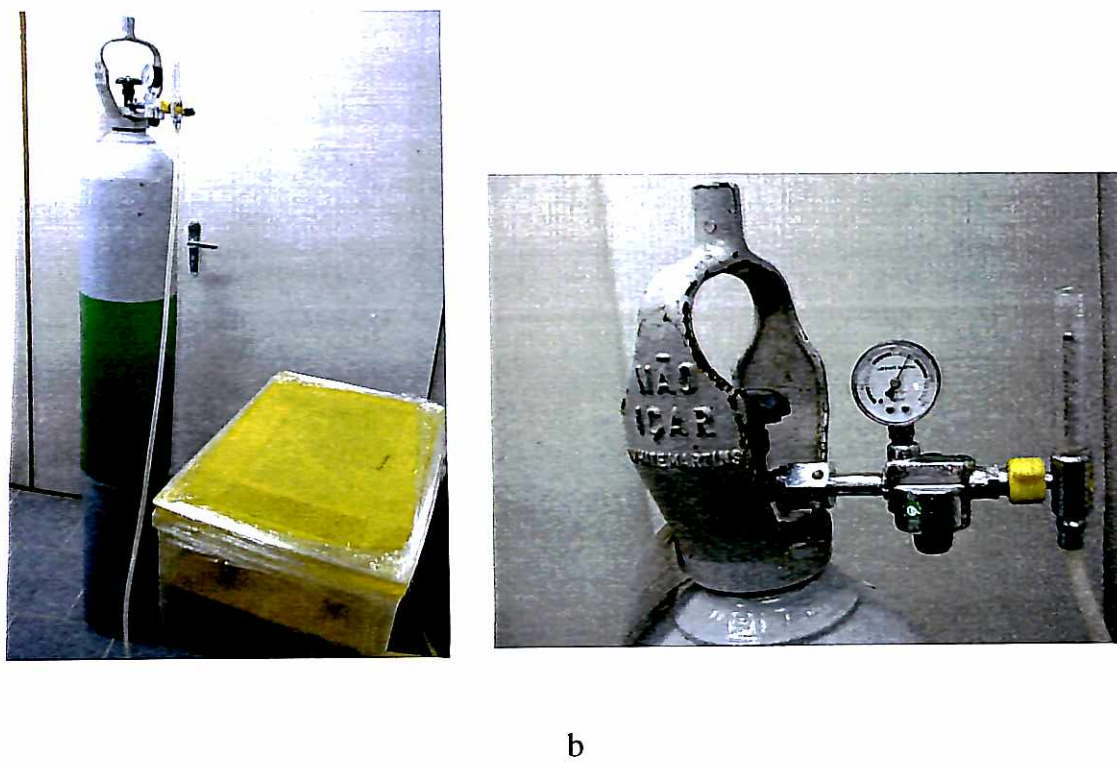


Figura 6 – a - Cilindro de ar comprimido com regulador, mangueira e caixa. b - Cilindro, fluxometro e regulador.



Figura 7 – Ratos na área de inalação.

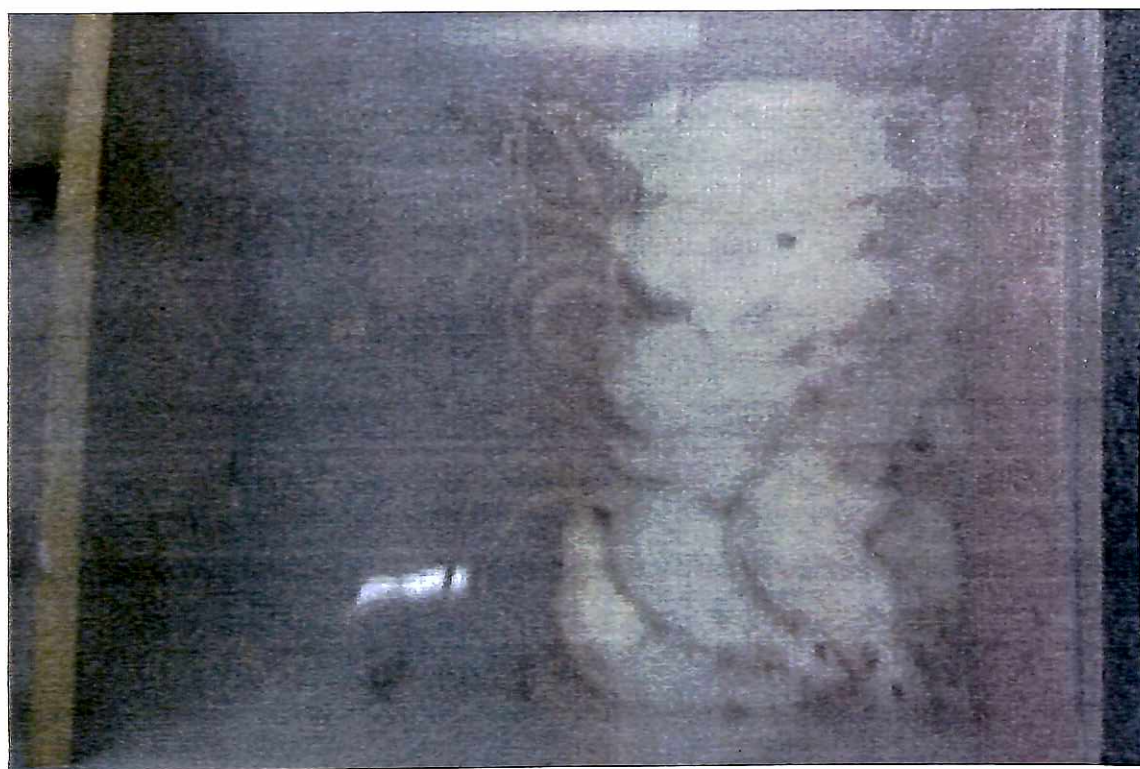


Figura 8 – Vista dos ratos na abertura da caixa após a indução do fumo.



Figura 9 – Queima dos cigarros após o período de indução.



Figura 10 – Anestesia dos animais.

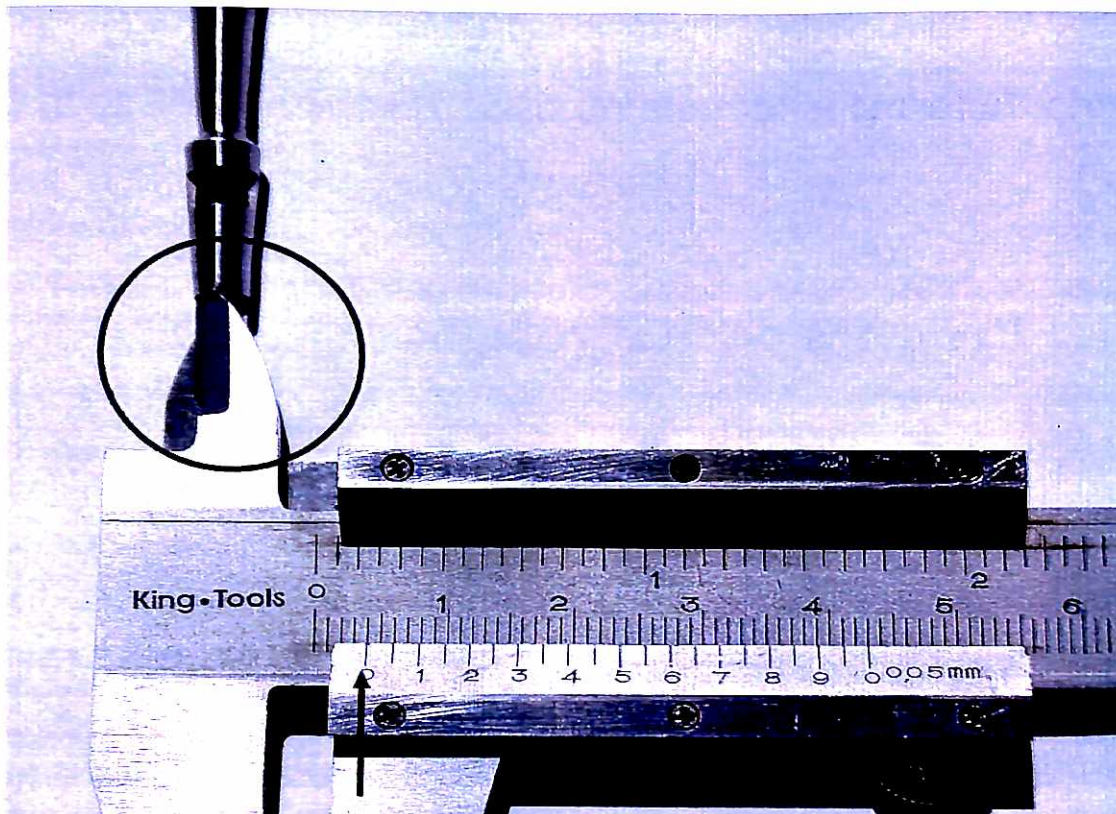


Figura 11 – Perfurador esférico de 4 milímetros de diâmetros, Guia para padronização do tamanho da lesão.

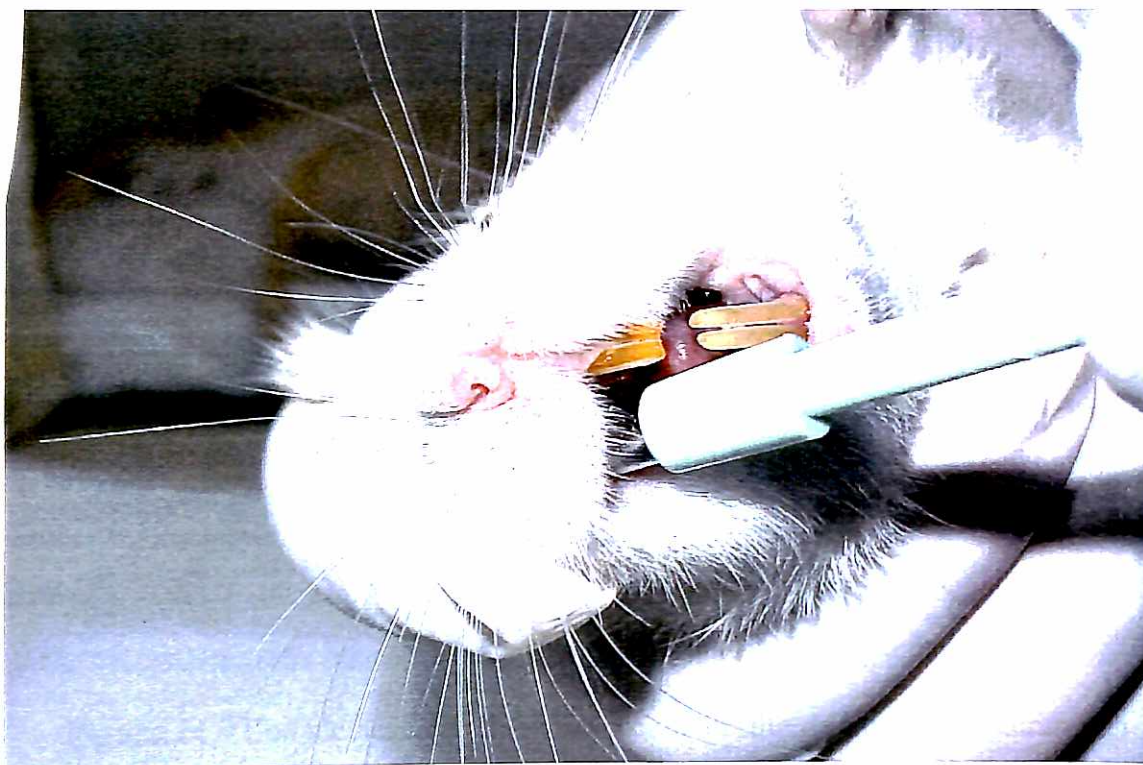


Figura 12 – Lesão inicial executada.

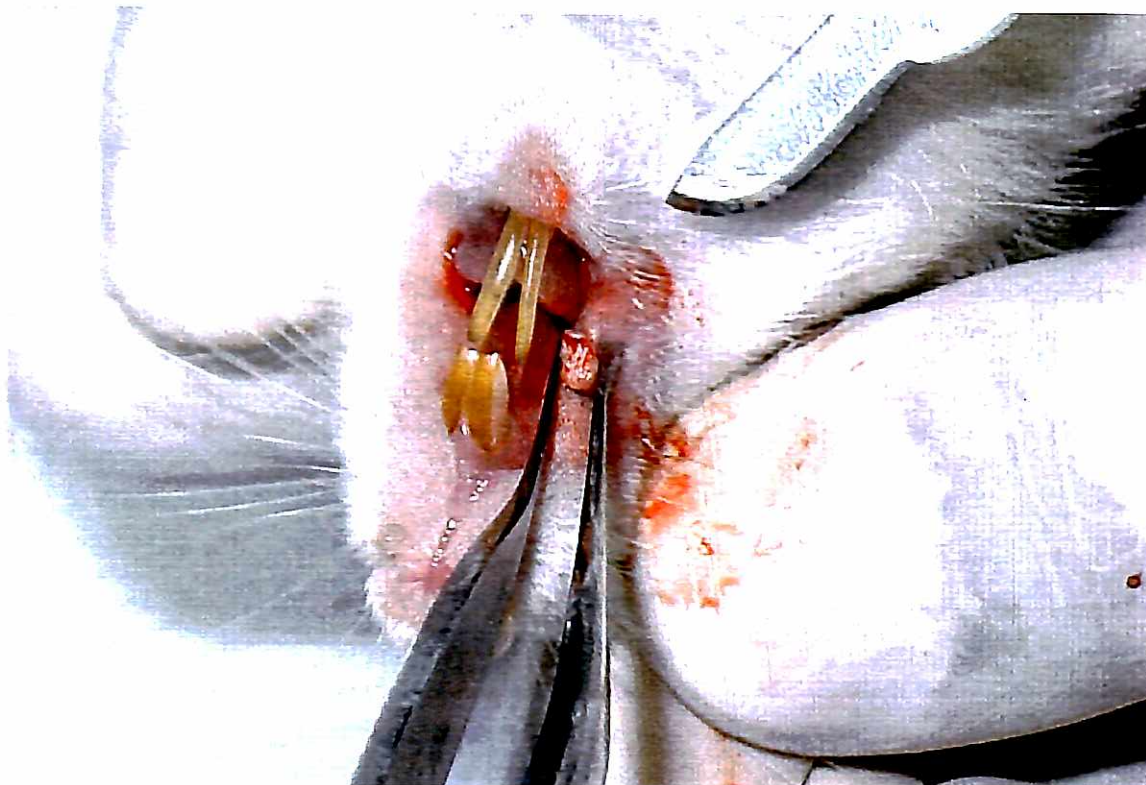


Figura 13 – Aspecto após incisão com perfurador esférico.



Figura 14 – Complementação da incisão com auxílio de um bisturi lâmina 15.



Figura 15 – Aspecto da lesão inicial



Figura 16 – Aspecto da formação de coagulo na lesão inicial.



Figura 17 – Aspecto do tecido retirado.



Figura 18 - Aspecto da lesão em regeneração

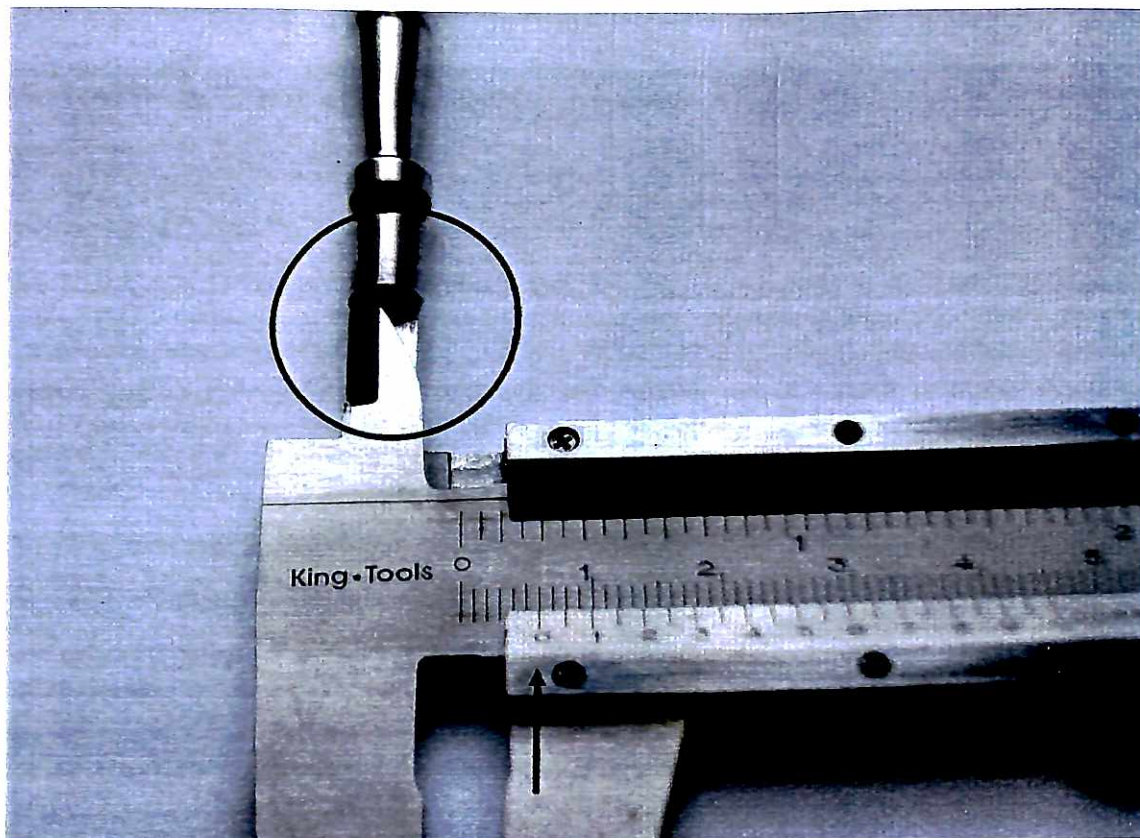


Figura 19 - Perfurador esférico utilizado pra retirar a amostra para análise histológica, com 6mm diâmetros

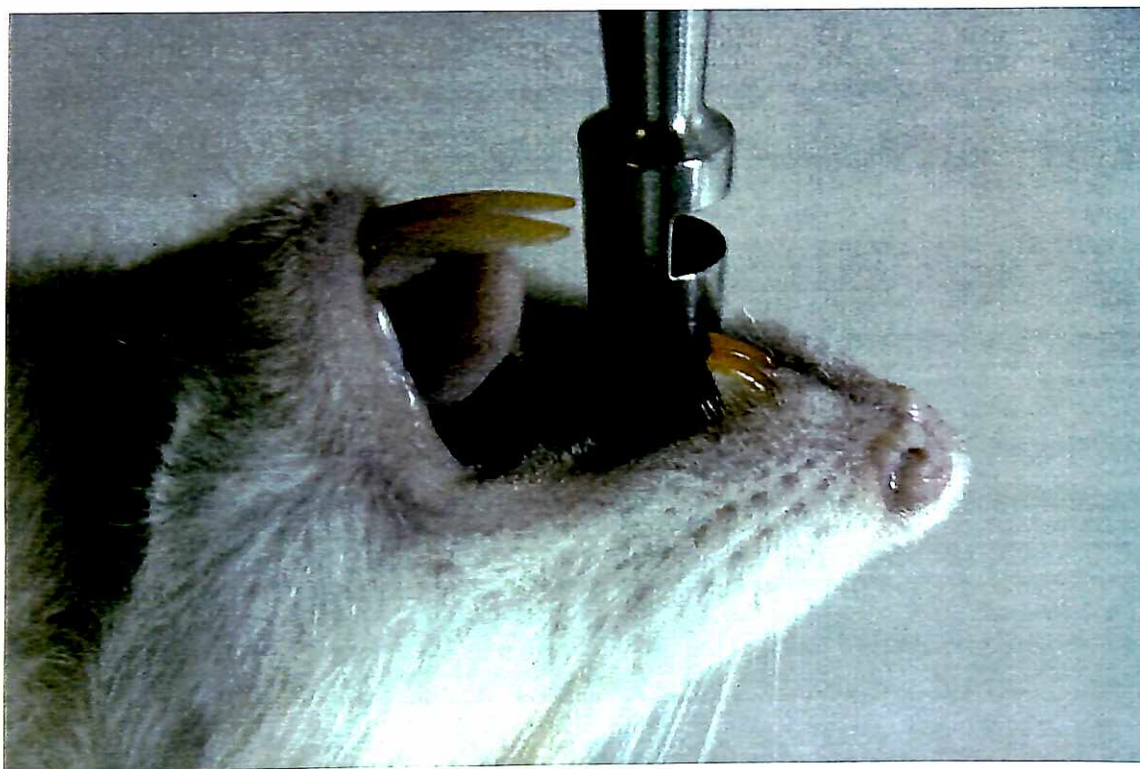


Figura 20– Retirada de amostra para análise histológica, com auxílio de perfurador esférico com 6mm de diâmetro.

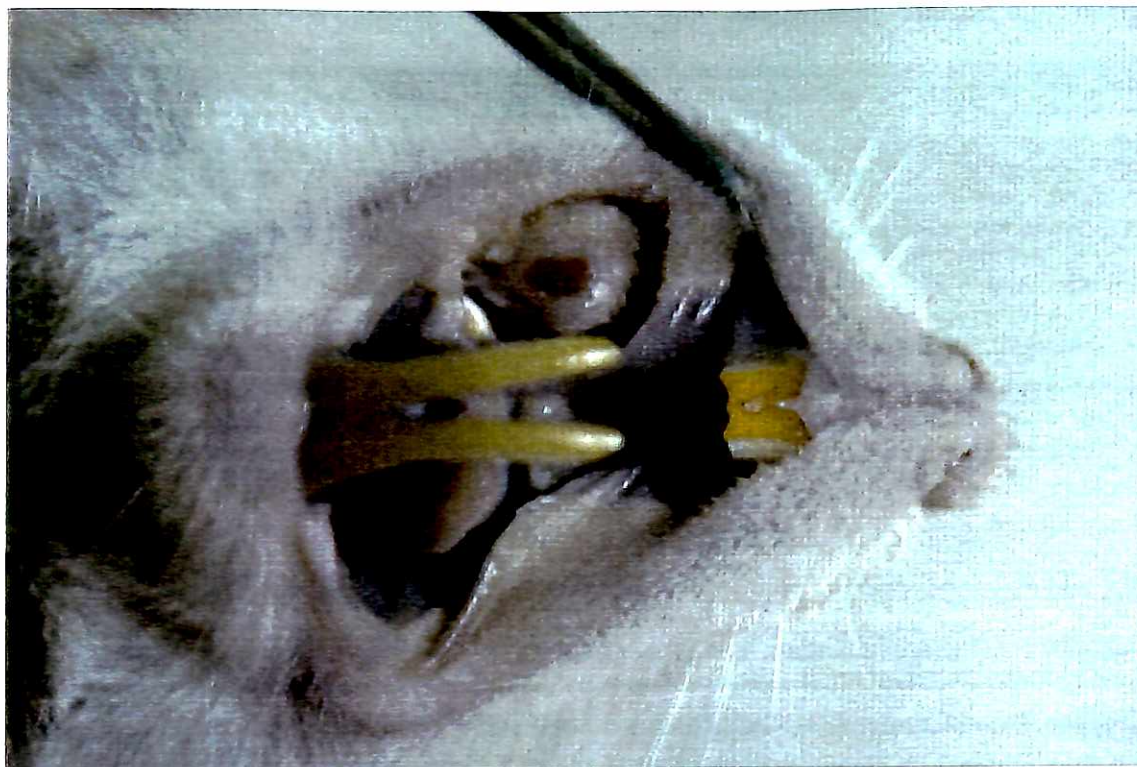


Figura 21 – Retirada da amostra pra avaliação Histológica.

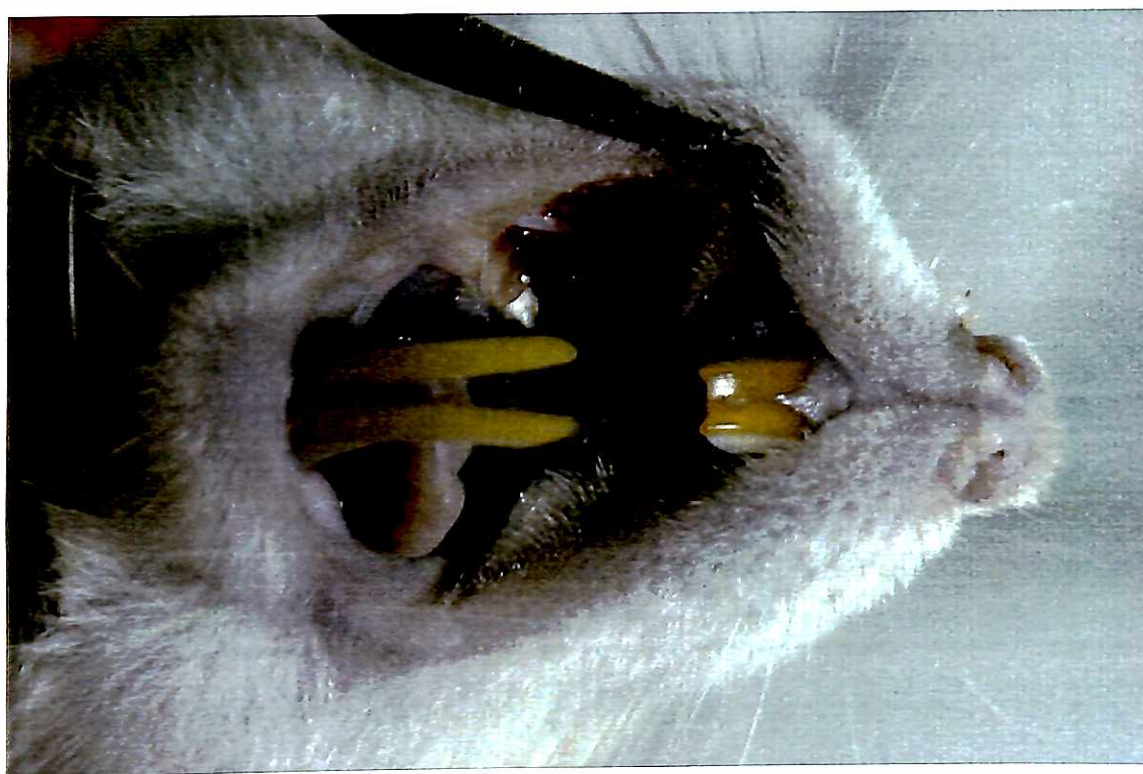


Figura 22 - Aspecto após retirada de amostra.



Figura 23 – Amostra com aproximadamente 6 mm de diâmetro, para envio a análise histológica.

5 RESULTADOS

5.1 Coleta de dado

5.1.1 Análise Clínica da Regeneração

Na avaliação clínica todos os animais foram sacrificados no período planejado (3, 5, 7 e 10 dias), possibilitando a realização das biópsias e avaliação histológica. Momentos antes, todos animais foram avaliados clinicamente por um único profissional previamente calibrado dentro de parâmetros pré-estabelecido em uma graduação descritiva do processo regenerativo (tabela 1), após a pontuação (tabela 2), foram realizadas as fotografias para registro desses resultados clínicos (figuras 24, 25, 26 e 27).

É importante ressaltar que um dos animais do grupo teste, depois da ferida cirúrgica, foi a óbito, no nono dia de regeneração, sendo então enviado pra necropsia (anexo 2), que não teve resultados conclusivos, pois o corpo do animal havia sido parcialmente destruído pelos outros animais que estavam na mesma gaiola. O veterinário responsável acredita que o fato de isso ter ocorrido na presença de alimento e água *ab litum*, poderia estar relacionado ao estresse desses animais. Uma das prováveis causas desse quadro de indução ao estresse pode ter sido devido a suspensão da exposição à fumaça de cigarro.

O quadro 2 mostra a graduação pontuada com auxílio do quadro 1 apresentada na metodologia, os parâmetros avaliados por um único profissional calibrado identificou presença de infecção, alteração de coloração, presença de edema e redução do perímetro. Os animais foram subdivididos em grupos por datas de 3, 5, 7, e 10 dias, como também dividido em um grupo controle de ratos exposto ao fumo de tabaco por todo período do experimento e um teste submetido a exposição de fumo de tabaco

O quadro a baixo mostra o resumo do resultado da avaliação clínica de 31 animais, comparando o grupo controle –fumante– ao grupo –ex-fumante–, a resposta foi graduada em boa, moderada e ruim, independentemente do período de avaliação, apresentou entre os grupos uma maior quantidade de animais com uma resposta boa e moderada na sua reparação tecidual.

Quadro 3 – Tabela de frequência de resposta.

Condição Resposta/ Resultado	Controle	Teste
Boa	9	10
Moderada	5	4
Ruim	2	1
Total (31)	16	15

Quando foi realizada uma comparação entre o grupo controle e teste na avaliação clínica, através do teste qui-quadrado, não apresenta diferença significativa, como também não se rejeitou a igualdade de proporções, no teste de proporções (quadro 3).

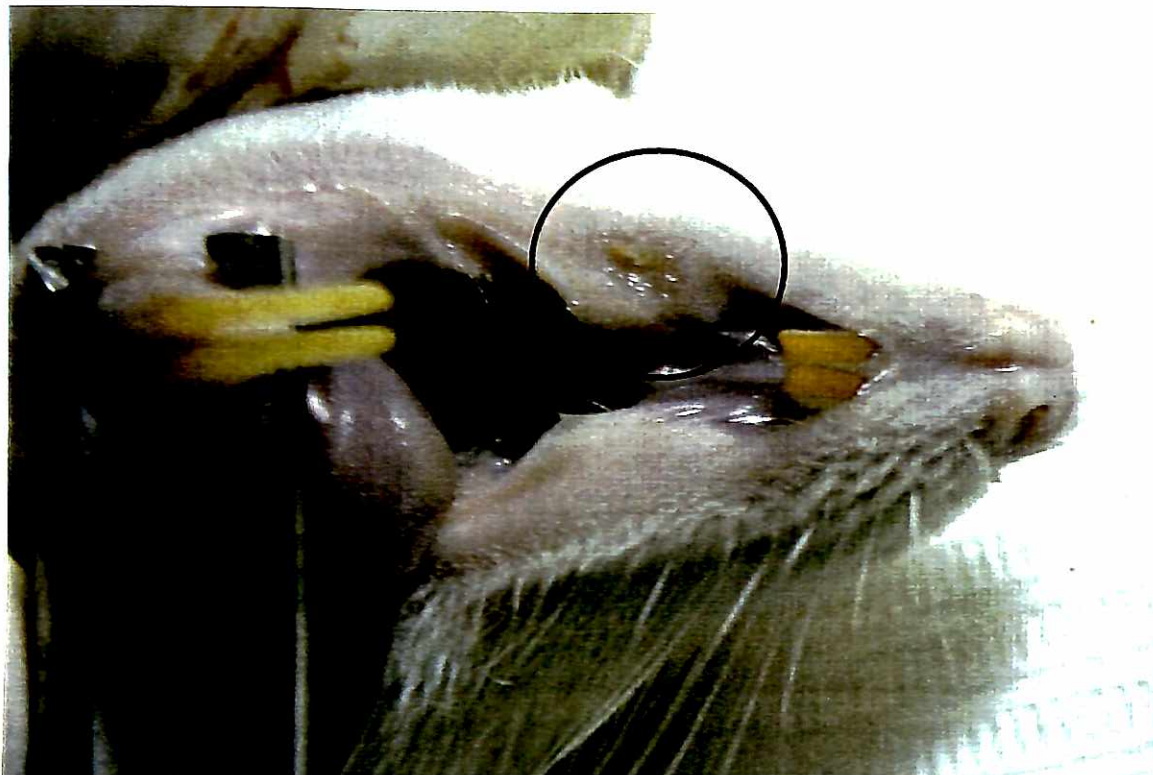


Figura 24 – Regeneração tecidual no terceiro dia do grupo controle.



Figura 25 – Regeneração tecidual no terceiro dia do grupo teste.

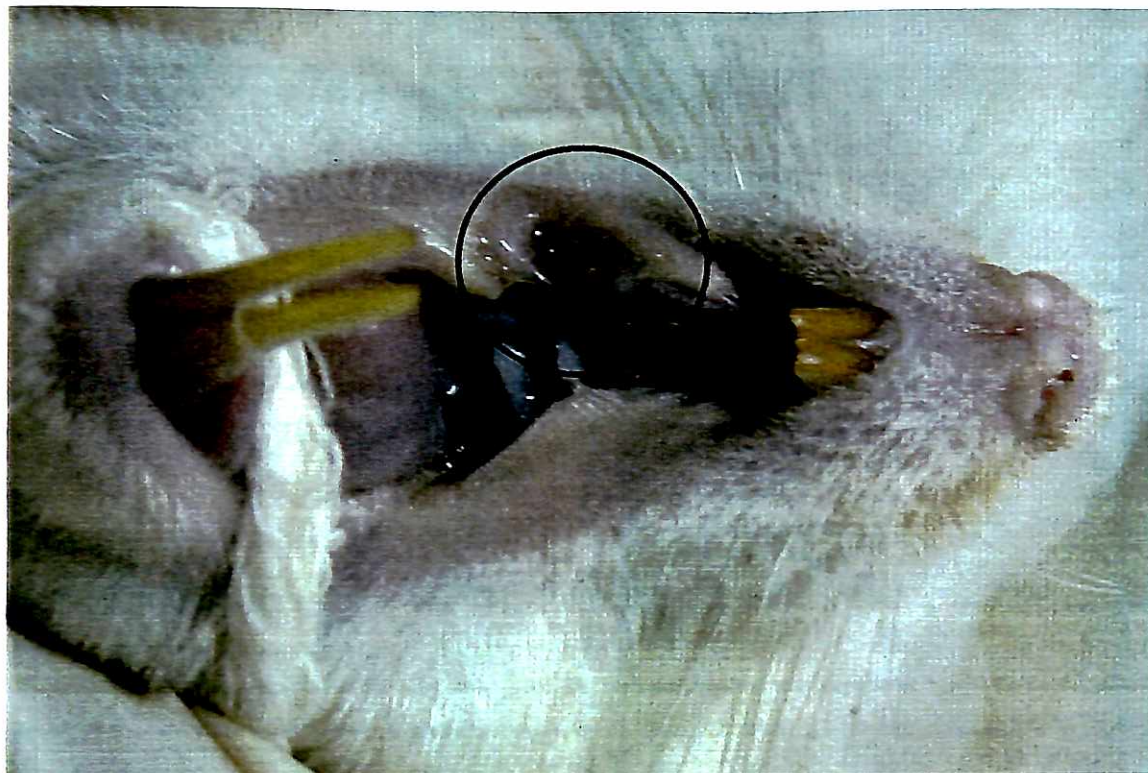


Figura 26 – Regeneração tecidual no quinto dia do grupo controle.

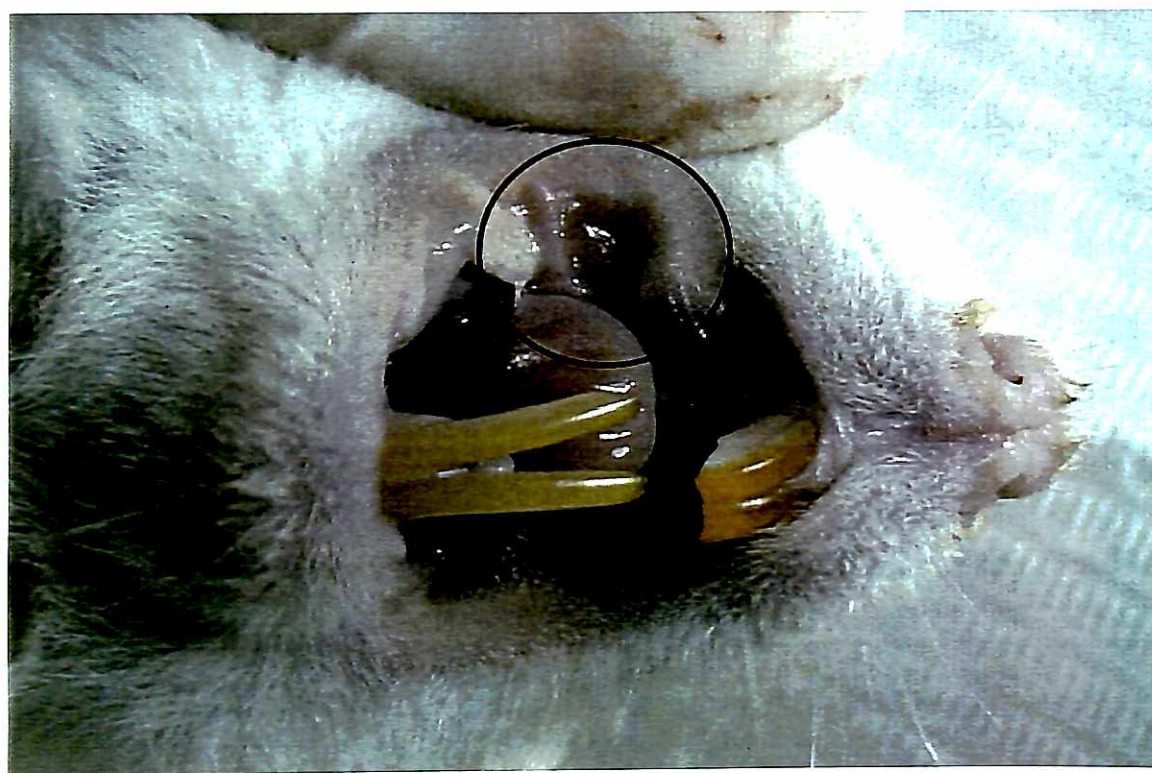


Figura 27 – Regeneração tecidual no quinto dia do grupo teste.



Figura 28 – Regeneração tecidual no sétimo dia do grupo controle.

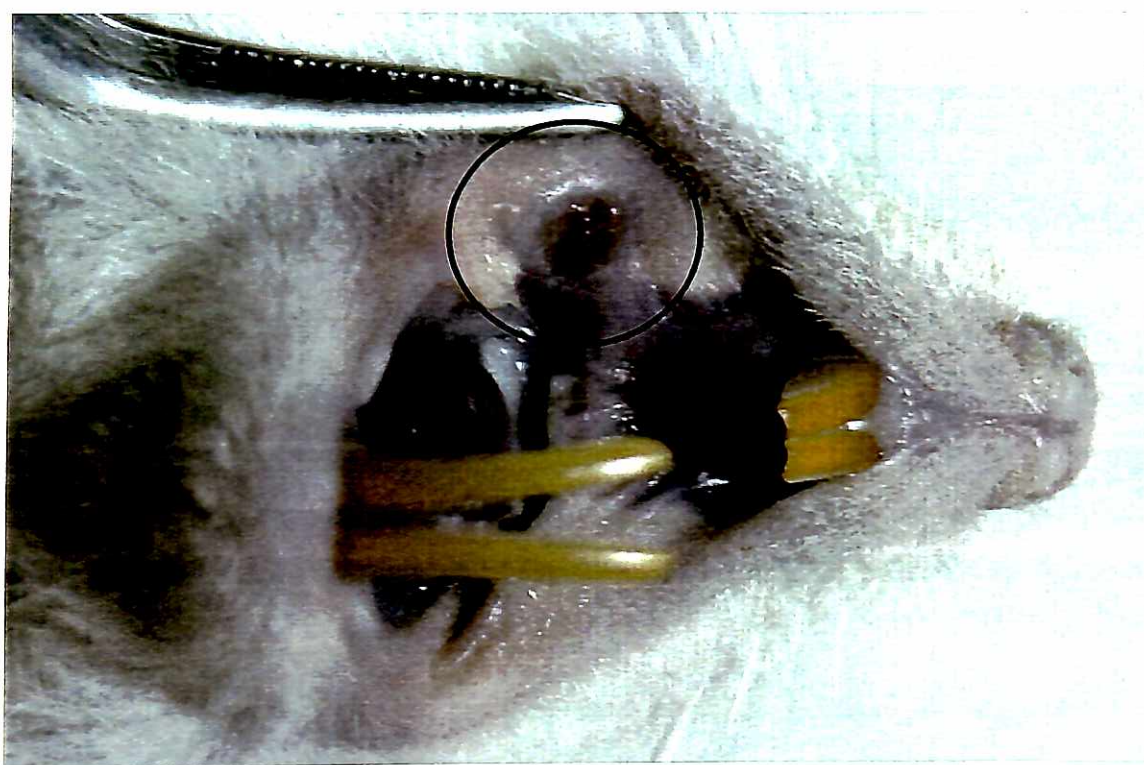


Figura 29 – Regeneração tecidual no sétimo dia do grupo teste.

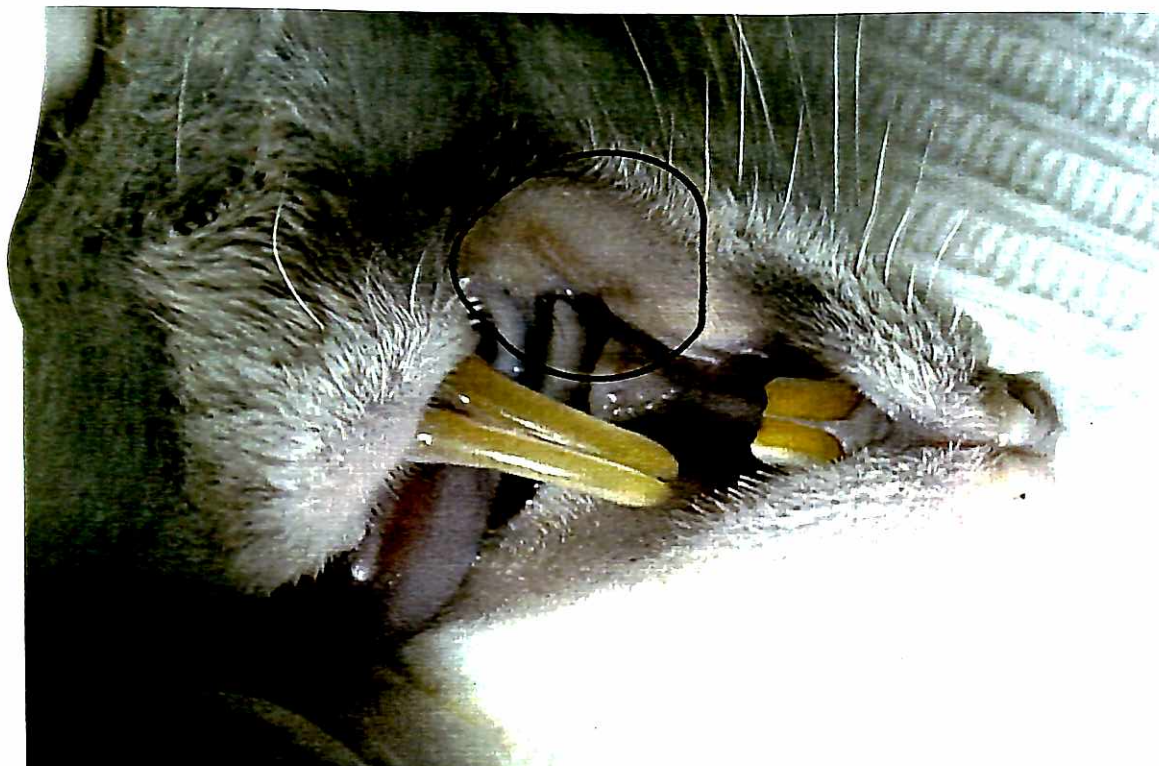


Figura 30 – Regeneração tecidual no décimo dia do grupo controle.



Figura 31 – Regeneração tecidual no décimo dia do grupo teste.

5.1.2 Análise Histológica da Regeneração

5.1.2.1 Fase Inflamatória

5.1.2.1.1 Presença de Neutrófilos

Os neutrófilos são normalmente presentes no início do processo inflamatório. Sua persistência pode significar contaminação bacteriana ou retardo na evolução do processo regenerativo. Os neutrófilos são predominantemente agentes fagocíticos extracelulares bacteriano. Apesar de avaliar a quantidade de neutrófilos, esta pesquisa não avaliou se houve redução na sua capacidade funcional.

O quadro quatro demonstra os resultados histológicos graduado por quatro diferentes avaliadores como referido na metodologia descrita anteriormente, avaliação dos 31 animais de grupos distintos, um grupo teste composto de animais expostos ao hábito de fumar com suspensão do fumo uma semana antes da realização da ferida cirúrgica, e um grupo controle composto de animais submetidos à exposição do cigarro até o final do experimento. Esta avaliação foi realizada em duplo-cego e subdividida por datas três, cinco, sete e dez dias depois da obtenção da ferida cirúrgica, para que assim possibilite o acompanhamento evolutivo do processo de reparação tecidual dos animais em questão. Um dos animais do grupo teste, depois da realização da ferida cirúrgica, foi a óbito, no décimo dia de regeneração, e nas tabelas a seguir este animal consta como excluído da pesquisa.

Quadro 4 – Análise por escala em cruzes da quantidade de neutrófilo

3º. Dia de reparação		Neutrofilos			
Animais		1º avaliador	2º. avaliador	3º. avaliador	4º. avaliador
Grupo Teste		++++	+++++	++++	+++
		++++	++++	++++	+++++
		++++	++++	++++	++++
		++++	++++	++++	++++
Grupo Controle		++++	++++	++++	+++
		++	+	++	++
		++	+++	+++	+++
		+++	+++	+++	++

5º. Dia de reparação		Neutrofilos			
Animais		1º avaliador	2º avaliador	3º. avaliador	4º. avaliador
Grupo Teste		++++	++++	++++	+++
		+	+	+	++
		+++	+++	+++	++
		+	++	++	++
Grupo Controle		+	++	+	++
		+	+	++	++
		+	+	+	+++
		+++	+++	+++	+++

7º. Dia de reparação		Neutrofilos			
Animais		1º avaliador	2º.avaliador	3º. avaliador	4º. avaliador
Grupo Teste		+	++	+	+
		+++	++++	+++	+++
		+	++	++	++
		+++	+	++	++
Grupo Controle		+	++	+	++
		+	+	++	+
		++	+	+	+
		+	+	+	+

10ºDia de reparação		Neutrofilos			
Animais		1º avaliador	2º. avaliador	3º. avaliador	4º. avaliador
Grupo Teste		+	+	+	+
		++++	++++	+++	+++
		+	++	++	+
		Excluído	Excluído	Excluído	Excluído
Grupo Controle		+	+	+	+
		++	+	++	+
		+	++	+	+
		+	+	+	+

Tabela 1 - Variações dos neutrófilos, em porcentagem.

NEUTRÓFILOS												
Dias	Alto/Muito alto				Moderado				Pouco/Muito pouco			
	Teste	%	Cont.	%	Teste	%	Cont.	%	Teste	%	Cont.	%
3º	15	93,75	3	18,75	1	6,25	6	37,5	0	0	7	43,75
5º	3	18,75	0	0	3	18,75	5	31,25	9	56,25	11	68,75
7º	1	6,25	0	0	4	25	0	0	10	62,5	16	100
10º	2	12,5	0	0	2	12,5	0	0	8	50	16	100

A tabela 1 demonstra a soma dos resultados e o cálculo em porcentagem das alterações na reparação tecidual quanto a contagem de neutrófilo realizado pelos diferentes avaliadores, comparando-os entre os grupos teste e controle, que pode ser mais bem compreendido com auxílio dos gráficos 1, 2 e 3 a seguir;

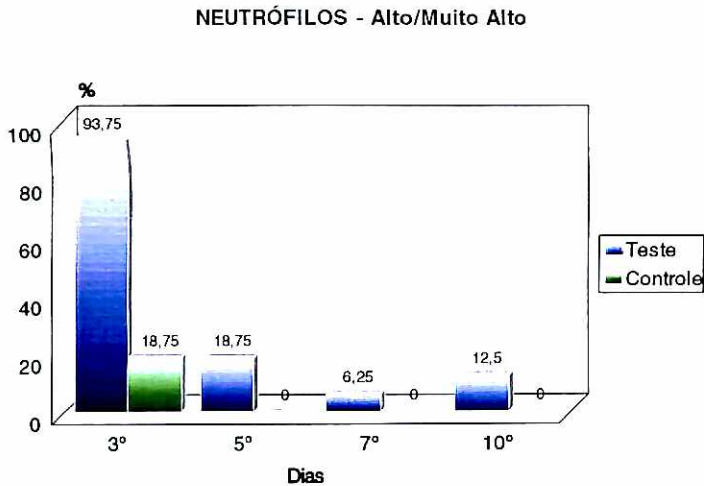


Gráfico 1 Variação de neutrófilos nos animais que apresentaram altas taxas em porcentagem.

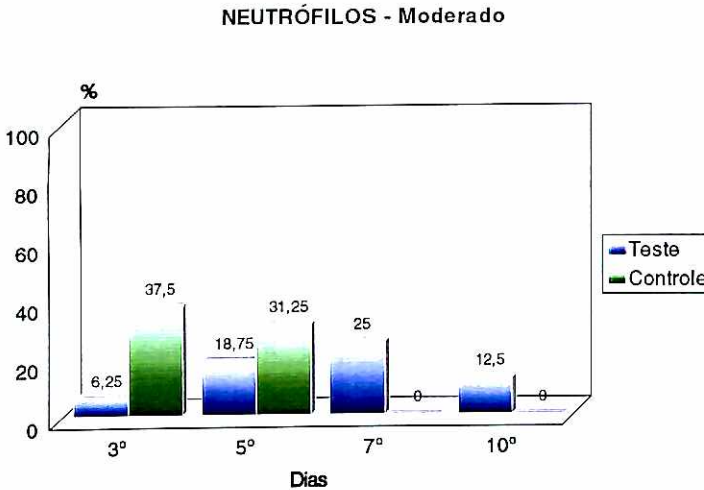


Gráfico 2 Variação de neutrófilos nos animais que apresentaram taxa moderada em porcentagem.

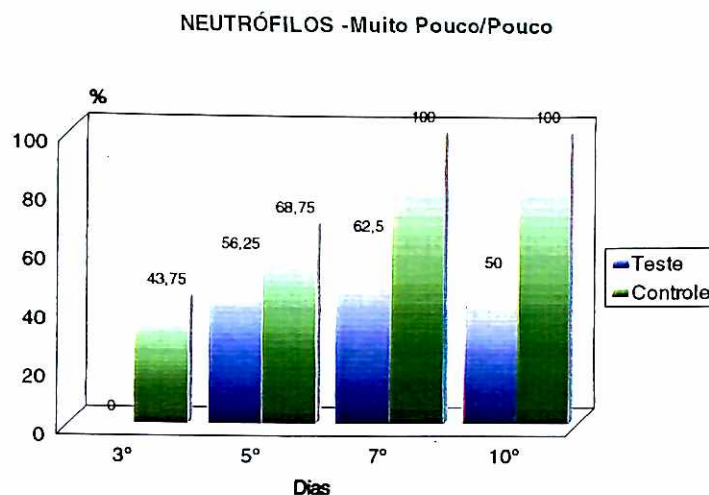


Gráfico 3 Variação de neutrófilos nos animais que apresentaram baixa taxa em porcentagem.

Os gráficos um, dois e três apresentam menor número de neutrófilos no grupo controle em comparação ao grupo teste. O grupo teste apresentou uma quantidade normal de neutrófilos nos três primeiros dias de reparação com conseqüente decréscimo ao passar dos dias. Houve um atraso no surgimento dos neutrófilos do grupo controle. – grupo fumante– que apresentou persistência dos mesmos nas fases final de reparação.

5.1.2.1.2 Presença de Edema

O edema ocorre antes mesmo do infiltrado neutrofílico. Edema do tipo transudativo é considerado normal no início e depois se transformam em exsudato. A presença do edema no início e na fase fibroblástica (neste caso devido à imaturidade de vasos neoformados – transudato) é comum. Entretanto a persistência de um edema pode indicar contaminação bacteriana ou retardo na maturação endotelial da angiogênese.

O quadro cinco demonstra os resultados histológicos de quatro diferentes avaliadores como referido na metodologia descrita anteriormente, avaliação dos animais em grupos distintos e em duplo-cego nos dias três, cinco, sete e dez.

Quadro 5 – Análise por escala em cruzes da quantidade de Edema

3º. Dia de reparação	Edema			
Animais	1º avaliador	2º. avaliador	3º. avaliador	4º. avaliador
Grupo Teste	+++	+++	+++	++
	+++	+++	+++	+++
	+++	+++	+++	+++
	+++	+++	+++	++
Grupo Controle	+++	+++	+++	++
	+++	+++	+++	++
	++	+	+	++
	++	++	++	+++

5º. Dia de reparação	Edema			
Animais	1º avaliador	2º. avaliador	3º. avaliador	4º. avaliador
Grupo Teste	++	+	++	++
	++	++	+	+
	++	++	++	+++
	+++	+++	+++	++
Grupo Controle	+++	+++	+++	++
	++++	++++	++++	++++
	+++	+++	+++	+++
	+++	+++	++++	++++

7º. Dia de reparação	Edema			
Animais	1º avaliador	2º. avaliador	3º. avaliador	4º. avaliador
Grupo Teste	+++	+++	++++	+++
	+	++	++	++
	+++	+++	+++	++
	++	+	+	+
Grupo Controle	+++	+++	+++	++
	++	++	++	+
	+++	+++	+++	+++
	++	++	+	+

10ºDia de reparação	Edema			
Animais	1º avaliador	2º. avaliador	3º. avaliador	4º. avaliador
Grupo Teste	+++	+++	+++	++
	++	+	++	+
	++	+	++	+
	Excluído	Excluído	Excluído	Excluído
Grupo Controle	++	++	° ++	+
	+	+	++	+
	+	+	++	+
	+	+	++	+

Tabela 2 - Variações na presença de edema, em porcentagem.

EDEMA												
Dias	Alto/Muito alto				Moderado				Pouco/Muito pouco			
	Teste	%	Cont.	%	Teste	%	Cont.	%	Teste	%	Cont.	%
3º	0	0	0	0	14	87,5	7	43,75	2	12,5	9	56,25
5º	0	0	6	37,5	4	25	9	56,25	12	75	1	6,25
7º	1	6,25	0	0	6	37,5	7	43,75	9	56,25	9	56,25
10º	0	0	0	0	3	18,75	0	0	9	56,25	16	100

A tabela 2 demonstra a soma dos resultados e o cálculo em porcentagem das alterações na reparação tecidual quanto ao processo de edema realizado pelos diferentes avaliadores, comparando-os entre os grupos teste e controle.

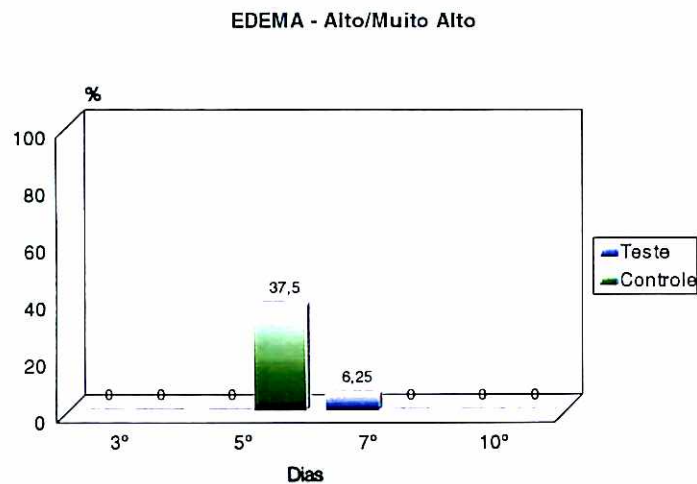


Gráfico 4 Variação de presença de edema nos animais que apresentaram alta taxa em porcentagem.

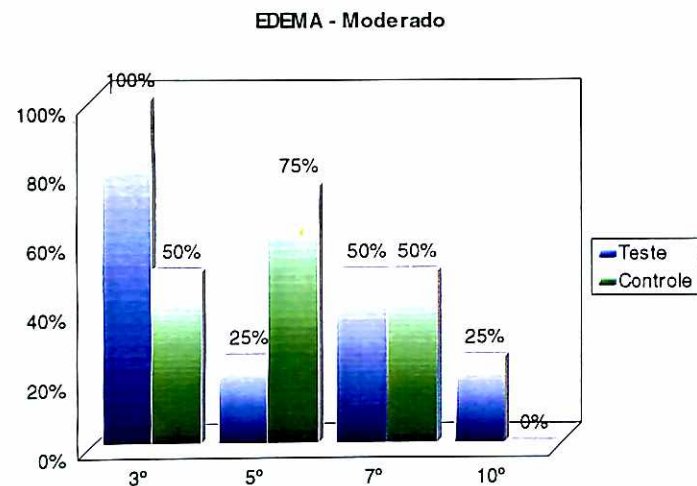


Gráfico 5 Variação de presença de edema nos animais que apresentaram taxa moderada, em porcentagem.

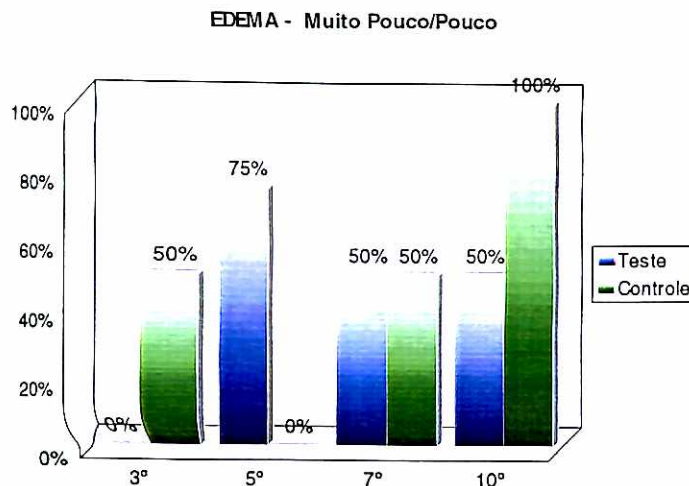


Gráfico 6 Variação de presença de edema nos animais que apresentaram baixa taxa, em porcentagem.

O edema nos gráficos 4, 5, e 6 é encontrado de forma moderada no grupo teste nas fases iniciais de reparação decrescido com o passar do tempo, já no grupo controle o edema é mantido de forma moderada ou baixa durante quase todo o período de avaliação.

5.1.2.1.3 Presença de Macrófagos

A presença de macrófagos é normal após a fase de edema e neutrófilia. Sua função é fundamental no processo de reparo da ferida. Ajudam os neutrofilos na realização de fagocitose interna de debris. Também mantém a inflamação ativa, estimula a produção de colágeno pelos fibroblastos e estimula neo vascularizações. O aumento de macrófagos no local é indicativo de boa regeneração embora o excesso deles sugira contaminação.

O quadro a seguir demonstra os resultados histológicos quanto ao número de macrófagos encontrados nas lâminas dos animais de grupos distintos em períodos de três, cinco, sete e dez dias, avaliadas por quatro avaliadores, em duplo-cego como referido na metodologia descrita anteriormente.

Quadro 6 – Análise por escala em cruzes da quantidade de Macrófagos

3º. Dia de reparação		Macrófagos			
Animais		1º avaliador	2º. avaliador	3º. avaliador	4º. avaliador
Grupo Teste		++	+	++	+
		+++	+++	+++	++++
		+++	++	+++	++
		++	+	+	+
Grupo Controle		+++	+++	+++	++
		++	+	++	+
		++	++	++	+
		+++	+++	+++	++

5º. Dia de reparação		Macrófagos			
Animais		1º avaliador	2º. avaliador	3º. avaliador	4º. avaliador
Grupo Teste		+++	+++	+++	++
		+++	+++	+++	+++
		+++	+++	+++	++++
		+	+	++	+
Grupo Controle		+++	+++	+++	++
		+++	+++	+++	+++
		++	+	++	+
		+++	+++	+++	++

7º. Dia de reparação		Macrófagos			
Animais		1º avaliador	2º. avaliador	3º. avaliador	4º. avaliador
Grupo Teste		++	+	++	+
		++	++	+	+
		+++	+++	+++	++
		++++	++++	++++	+++
Grupo Controle		++	+	+	+
		+++	+++	+++	++
		++	+	++	+
		+++	+++	+++	++

10ºDia de reparação		Macrófagos			
Animais		1º avaliador	2º. avaliador	3º. avaliador	4º. avaliador
Grupo Teste		++	+	++	++
		+++	+++	+++	++
		+++	+++	+++	++
		Excluído	Excluído	Excluído	Excluído
Grupo Controle		++	++	++	++
		++++	++++	++++	+++
		+	+	++	+
		+++	+++	+++	++

Tabela 3 - Variações na presença de macrófago, em porcentagem.

Dias	MACRÓFAGOS											
	Alto/Muito alto				Moderado				Pouco/Muito pouco			
	Teste	%	Cont.	%	Teste	%	Cont.	%	Teste	%	Cont.	%
3°	1	6,25	0	0	5	31,25	6	37,5	10	62,5	10	62,5
5°	1	6,25	0	0	10	62,5	10	62,5	5	31,25	6	37,5
7°	3	18,75	0	0	4	25	6	37,5	9	56,25	10	62,5
10°	0	0	3	18,75	6	37,5	4	25	6	37,5	9	56,25

A tabela três demonstra a soma dos resultados e o cálculo em porcentagem das alterações na reparação tecidual quanto ao processo à presença de macrófago realizado pelos diferentes avaliadores, comparando-os entre os grupos teste e controle é evidenciado similaridades entre os mesmos.

5.1.2.2 Fase Fibroblática

5.1.2.2.1 Fibroplastia e níveis de colágeno

O início da fase fibroblástica, caracteriza-se pela presença de fibroblastos ativos e fibras de colágenos desarranjadas que possuem crescimento centrípeto, com o tempo e a localização destes na ferida indica a evolução do processo regenerativo. A presença de fibras de colágenos indica indiretamente a atuação e funcionamento dos macrófagos e fibroblastos. Baixo índice de colágeno sugere pobre regeneração. Excesso de colágeno pode indicar processo de formação de quelóide.

O quadro a seguir demonstra os resultados histológicos quanto aos níveis de colágenos e fibroplastias encontrados nas lâminas os animais de grupos distintos em três, cinco, sete e dez dias, graduadas por quatro avaliadores como referido na metodologia descrita anteriormente.

Quadro 7 – Análise por escala em cruzes da Fibroplastia e níveis de colágeno.

3º. Dia de reparação		Fibroplastia e níveis de colágeno			
Animais		1º avaliador	2º. avaliador	3º. avaliador	4º. avaliador
Grupo Teste		+++	+++	+++	++
		+++	+++	+++	+++
		+++	+++	+++	++
		+++	+++	+++	+++
Grupo Controle		+++	+++	+++	++
		++	++	++	+
		++	++	++	++
		+++	+++	+++	++

5º. Dia de reparação		Fibroplastia e níveis de colágeno			
Animais		1º avaliador	2º. avaliador	3º. avaliador	4º. avaliador
Grupo Teste		++	+	++	+
		++++	++++	++++	+++
		++++	++++	++++	++++
		++++	++++	++++	++++
Grupo Controle		++++	++++	+++	++++
		+++	+++	++++	++++
		++	++	+	+
		+++	+++	+++	++

7º. Dia de reparação		Fibroplastia e níveis de colágeno			
Animais		1º avaliador	2º. avaliador	3º. avaliador	4º. avaliador
Grupo Teste		++++	++++	+++	++++
		+++	++++	+++	++++
		+++	++++	+++	++++
		++++	++++	+++	++++
Grupo Controle		++	+	++	+
		++++	++++	+++	++++
		+++	+++	+++	++
		+++	++++	+++	++++

10ºDia de reparação		Fibroplastia e níveis de colágeno			
Animais		1º avaliador	2º. avaliador	3º. avaliador	4º. avaliador
Grupo Teste		++	++	++	+++
		+++	+++	++++	++++
		+++	+++	++++	++++
		Excluído	Excluído	Excluído	Excluído
Grupo Controle		++++	++++	++++	+++
		++++	++++	++++	++++
		++++	++++	++++	++++
		++	+	++	++

Tabela 4 - Variações dos Fibroblastos e níveis de colágenos, em porcentagem.

FIBROPLASTIA E NÍVEIS DE COLÁGENO												
Dias	Alto/Muito alto				Moderado				Pouco/Muito pouco			
	Teste	%	Cont.	%	Teste	%	Cont.	%	Teste	%	Cont.	%
3°	0	0	0	0	14	87,5	6	37,5	2	12,5	10	62,5
5°	11	68,75	5	31,25	1	6,25	6	37,5	4	25	5	31,25
7°	10	62,5	5	31,25	6	37,5	6	37,5	0	0	5	31,25
10°	4	25	11	68,75	5	31,25	1	6,25	3	18,75	4	25

A tabela quatro demonstra a soma dos resultados e o cálculo em porcentagem das alterações na reparação tecidual quanto ao processo à fibroplastia e níveis de colágenos realizado pelos diferentes avaliadores, comparando-os entre os grupos teste e controle.

FIBROPLASTIA E NÍVEIS DE COLÁGENO Alto/Muito Alto

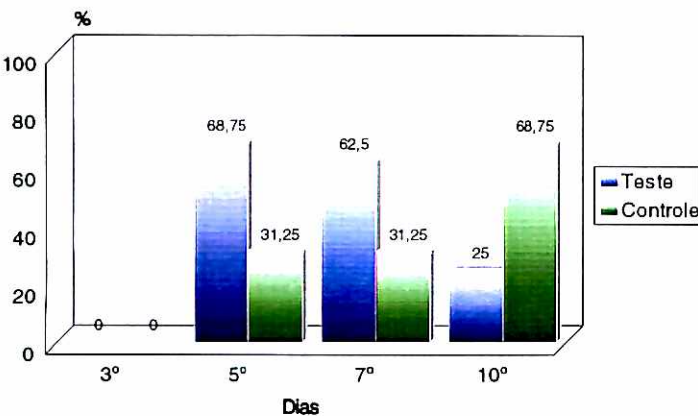


Gráfico 7 Variação de fibroplastia e níveis de colágenos nos animais que apresentaram alta taxa, em porcentagem.

FIBROPLASTIA E NÍVEIS DE COLÁGENO - Moderado

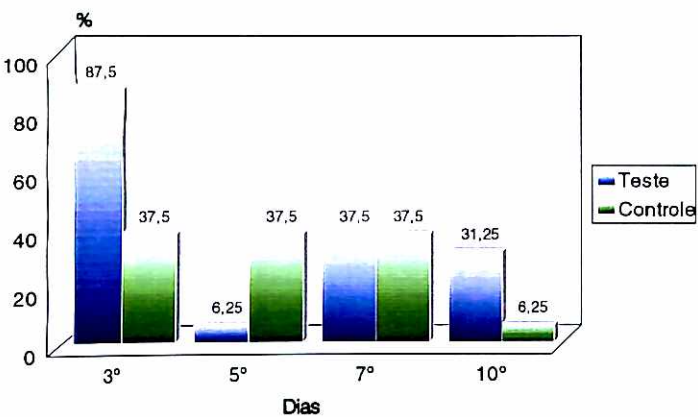


Gráfico 8 Variação de fibroplastia e níveis de colágenos nos animais que apresentaram moderada taxa, em porcentagem.

FIBROPLASTIA E NÍVEIS DE COLÁGENO Muito Pouco/Pouco

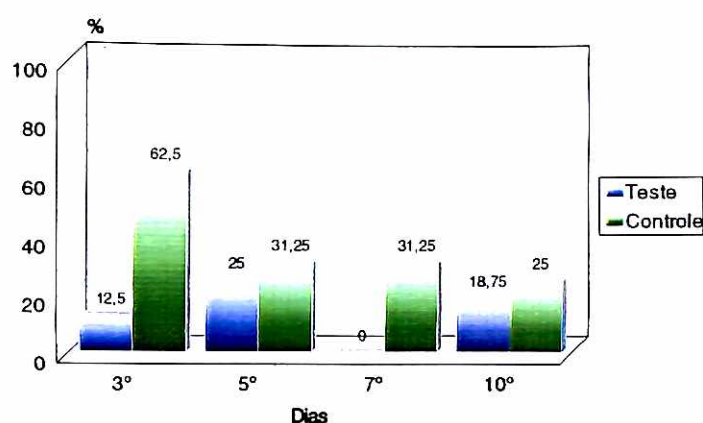


Gráfico 9 Variação de fibroplastia e níveis de colágenos nos animais que apresentaram baixa taxa, em porcentagem.

O grupo teste –ex-fumante– inicia a fase de fibroplastia primeiro que o grupo controle –fumante–, porém apesar do atraso na da fibropastia e níveis de colágenos o grupo controle aproxima e recupera mais tardiamente ao desenvolvimento encontrado no grupo teste.

5.1.2.2.2 Neovascularização

Ocorre simultaneamente com o crescimento centrípeto dos fibroblastos. O quadro a oito demonstra os resultados histológicos quanto à neoformação de vasos, e artérias, encontrados nas lâminas dos animais de cada grupo distinto nos três, cinco, sete e dez dias, graduadas por quatro avaliadores como referido na metodologia descrita anteriormente.

Quadro 8 – Análise por escala em cruzes da presença de Neovascularização.

3°. Dia de reparação	Neovascularização			
Animais	1° avaliador	2°. avaliador	3°. avaliador	4°. avaliador
Grupo Teste	+++	+++	+++	++
	+++	+++	+++	+++
	+++	+++	+++	++
	+++	+++	+++	++++
Grupo Controle	+++	++	+++	++
	++	+	+++	++
	++	++	+	+
	+++	+++	+++	++

5°. Dia de reparação	Neovascularização			
Animais	1° avaliador	2°. avaliador	3°. avaliador	4°. avaliador
Grupo Teste	++	+	++	++
	++++	++++	++++	+++++
	++++	++++	++++	+++
	++++	++++	++++	+++
Grupo Controle	++++	++++	+++	+++
	+++	+++	++++	+++
	++	++	+	++
	+++	+++	+++	++

7°. Dia de reparação	Neovascularização			
Animais	1° avaliador	2°. avaliador	3°. avaliador	4°. avaliador
Grupo Teste	++++	++++	+++	++++
	+++	++++	+++	++++
	+++	++++	+++	+++
	++++	++++	+++	+++
Grupo Controle	++	+	++	+
	++++	++++	+++	++
	+++	+++	+++	+++
	+++	++++	+++	+++

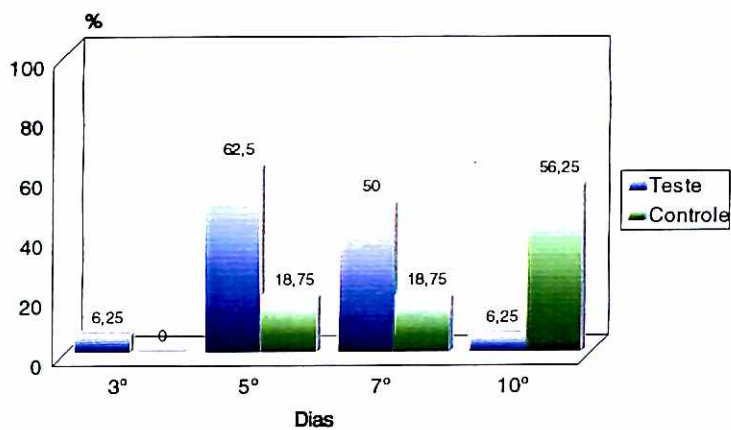
10°Dia de reparação	Neovascularização			
Animais	1° avaliador	2°. avaliador	3°. avaliador	4°. avaliador
Grupo Teste	++	++	+++	++
	+++	++	+++	+++
	+++	+++	+++	++++
	Excluído	Excluído	Excluído	Excluído
Grupo Controle	++++	++++	++++	+++
	++++	++++	++++	+++
	++++	++++	++++	+++
	++	+	++	+

Tabela 5 - Variações da neovascularização e níveis de colágenos, em porcentagem

NEOVASCULARIZAÇÃO												
Dias	Alto/Muito alto				Moderado				Pouco/Muito pouco			
	Teste	%	Cont.	%	Teste	%	Cont.	%	Teste	%	Cont.	%
3°	1	6,25	0	0	13	81,25	6	37,5	2	12,5	10	62,5
5°	10	62,5	3	18,75	2	12,5	8	50	4	25	5	31,25
7°	8	50	3	18,75	8	50	8	50	0	0	5	31,25
10°	1	6,25	9	56,25	7	43,75	3	18,75	4	25	4	25

A tabela 5 demonstra a soma dos resultados e o cálculo em porcentagem das alterações na reparação tecidual quanto ao processo de neovascularização, comparando-os entre os grupos teste e controle. Apresentaram diferença entre eles nos dias 3 e 7, como será demonstrado nos gráficos 10, 11 e 12;

NEOVASCULARIZAÇÃO - Alto/Muito Alto



c

Gráfico 10 Variação de neovascularização nos animais que apresentaram alta taxa, em porcentagem.

NEOVASCULARIZAÇÃO - Moderado

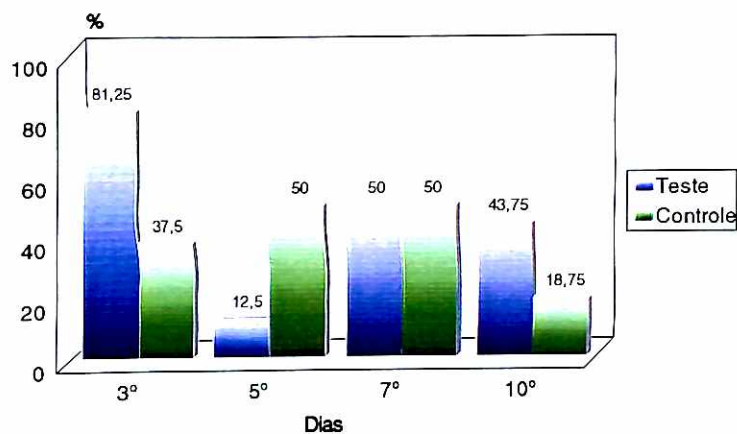


Gráfico 11 Variação de neovascularização nos animais que apresentaram moderada taxa, em porcentagem.

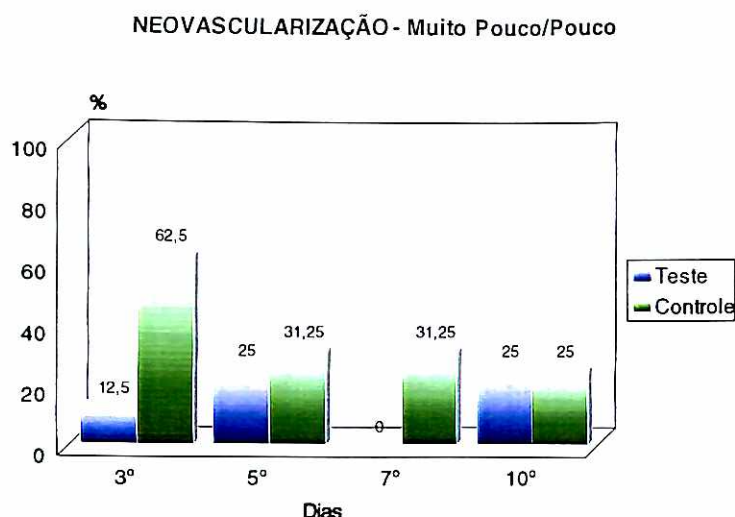


Gráfico 12 Variação de neovascularização nos animais que apresentaram moderada taxa, em porcentagem.

Os gráficos 10, 11 e 12 demonstram atraso na neovascularização nos primeiros dias do grupo controle em comparação ao grupo teste de ex-fumantes.

5.1.2.2.3 Contração de ferida

Há a aproximação das margens da ferida realacionada a ação dos miofibroblastos, que ocorre no final do processo regenerativo. O quadro nove demonstra os resultados histológicos quanto à presença de miofibroblastos encontrados nas lâminas dos animais de cada grupo em diferentes períodos de três, cinco, sete e dez dias, graduadas por quatro avaliadores como referido na metodologia descrita anteriormente.

Quadro 9 – Análise por escala em cruzes da presença de Miofibroblastos.

3º. Dia de reparação	Miofibroblastos			
Animais	1º avaliador	2º. avaliador	3º. avaliador	4º. avaliador
Grupo Teste	++	+++	++	++
	++++	++++	+++	++++
	++	++	++	+
	+++	++++	++	+++
Grupo Controle	+++	++	+++	++
	+++	+++	+++	++++
	++	++	+++	++
	++	++	++	+

5º. Dia de reparação	Miofibroblastos			
Animais	1º avaliador	2º. avaliador	3º. avaliador	4º. avaliador
Grupo Teste	+++	+++	++++	+++
	+++	++	+++	+++
	++++	+++	++++	++++
	++	++	+++	++
Grupo Controle	++++	++++	++++	+++++
	+++	+++	+++	++++
	+++	+++	+++	++
	+++	+++	+++	+++

7º. Dia de reparação	Miofibroblastos			
Animais	1º avaliador	2º. avaliador	3º. avaliador	4º. avaliador
Grupo Teste	++	++	+++	++
	++++	++++	+++	++++
	++	++	+++	++
	++++	++++	+++	++++
Grupo Controle	++++	++++	++	+++
	+++	+++	+++	++
	++++	++++	+++	++++
	++++	++++	+++	+++

10ºDia de reparação	Miofibroblastos			
Animais	1º avaliador	2º. avaliador	3º. avaliador	4º. avaliador
Grupo Teste	++	++	+++	++
	+++	++	+++	+++
	+++	+++	+++	++++
	Excluído	Excluído	Excluído	Excluído
Grupo Controle	++++	++++	++++	+++++
	++++	++++	+++	+++
	++++	+++	+++	+++
	++	+	++	+

Tabela 6 - Variações da contração da ferida, em porcentagem

CONTRAÇÃO DA FERIDA												
Dias	Alto/Muito alto				Moderado				Pouco/Muito pouco			
	Teste	%	Cont.	%	Teste	%	Cont.	%	Teste	%	Cont.	%
3°	4	25	1	6,25	4	25	6	37,5	8	50	9	56,25
5°	4	25	5	31,25	8	50	10	62,5	4	25	1	6,25
7°	6	37,5	7	43,75	4	25	7	43,75	6	37,5	2	12,5
10°	1	6,25	7	43,75	7	43,75	5	31,25	4	25	4	25

A tabela seis demonstra a soma dos resultados e o cálculo em porcentagem das alterações na contração do tecido em reparação quanto à presença de miofibroblastos realizado pelos diferentes avaliadores, comparando-os entre os grupos teste e controle, é evidenciado similaridades entre os mesmos.

5.1.2.2.4 Reepitelização

Formação de tecido epitelial novo na superfície da ferida com hiperplasia de células da camada basal. É um bom indicativo. Ocorre no final do processo regenerativo. Há a aproximação das margens da ferida relacionada a ação dos miofibroblastos, que ocorre no final do processo regenerativo. O quadro a seguir demonstra os resultados histológicos quanto ao processo de reepitelização encontrados nas lâminas dos animais de cada grupo em três, cinco, sete e dez dias, graduadas por quatro avaliadores como referido na metodologia descrita anteriormente.

Quadro 10 – Análise por escala em cruzes da presença de reepitelização.

3°. Dia de reparação		Reepitelização			
Animais		1° avaliador	2°. avaliador	3°. avaliador	4°. avaliador
Grupo Teste		++	++	+	+
		++	++	+++	++
		+	+	+	+
		+++	++	+++	+++
Grupo Controle		++	++	++	+
		+++	+++	+++	++
		+++	+++	+++	++++
		++++	++++	++++	+++

5°. Dia de reparação		Reepitelização			
Animais		1° avaliador	2°. avaliador	3°. avaliador	4°. avaliador
Grupo Teste		++++	+++++	++++	+++++
		++	+	++	+
		++	++	+	+++
		++	++	++	+++
Grupo Controle		+++	+++	+++	++++
		++	++	+++	++
		+++	++	+++	+
		++	+	++	++

7°. Dia de reparação		Reepitelização			
Animais		1° avaliador	2°. avaliador	3°. avaliador	4°. avaliador
Grupo Teste		++++	++++	++++	+++++
		+++	+++	++++	++++
		++++	+++	++++	++++
		+++	+++	+++	++
Grupo Controle		++	+	++	+
		++++	++++	++++	+++
		++++	++++	++++	+++++
		++++	++++	++++	+++++

10°Dia de reparação		Reepitelização			
Animais		1° avaliador	2°. avaliador	3°. avaliador	4°. avaliador
Grupo Teste		++++	++++	++++	++++
		++++	++++	++++	++++
		++	++	+	+++
		Excluído	Excluído	Excluído	Excluído
Grupo Controle		++++	++++	++++	++++
		++	+	++	+
		++++	++++	++++	+++
		+++++	++++	++++	++++

Tabela 7 - Variações dos reepitelização, em porcentagem.

Dias	REEPITELIZAÇÃO											
	Alto/Muito alto				Moderado				Pouco/Muito pouco			
	Teste	%	Cont.	%	Teste	%	Cont.	%	Teste	%	Cont.	%
3°	0	0	4	25	4	25	7	43,75	12	75	5	31,25
5°	4	25	1	6,25	2	12,5	6	37,5	10	62,5	9	56,25
7°	9	56,25	11	68,75	6	37,5	1	6,25	1	6,25	4	25
10°	8	50	11	68,75	1	6,25	1	6,25	3	18,75	4	25

A tabela 7 demonstra a soma dos resultados e o cálculo em porcentagem das alterações na reparação tecidual quanto ao processo de reepitelização. Comparando-os entre os grupos teste e controle. Demonstram atraso na reepitelização do grupo controle em comparação ao grupo teste de ex-fumantes nos três primeiros dias, porém o grupo controle a partir do quinto dia acompanha o processo de reparação tecidual similar ao grupo teste.

5.1.2.2.5 Remodelamento e maturação

Caracterizada pelo rearranjo e organização de fibras colágenas. Fim de qualquer indício inflamatório. Os quadros a seguir demonstram os resultados histológicos quanto ao processo de reepitelização encontrados nas lâminas dos animais de cada grupo em diferentes períodos de três, cinco, sete e dez dias, graduadas por diferentes avaliadores como referido na metodologia descrita anteriormente. O quadro a seguir demonstra os resultados histológicos quanto ao processo de remodelamento e maturação encontrados nas lâminas dos animais de grupos distintos nos três, cinco, sete e dez dias, graduadas por quatro avaliadores como referido na metodologia descrita anteriormente.

Quadro 11 – Análise por escala em cruzes de remodelamento e maturação.

3º. Dia de reparação	Maturação			
Animais	1º avaliador	2º. avaliador	3º. avaliador	4º. avaliador
Grupo Teste	+	+	+	+
	+	+	+	+
	+	+	+	+
	++	++	++	+
Grupo Controle	++	++	++	+
	++++	++++	++++	+++
	++	++	++	+
	++	++	++	+

5º. Dia de reparação	Maturação			
Animais	1º avaliador	2º. avaliador	3º. avaliador	4º. avaliador
Grupo Teste	+	+	+	+
	++	++	++	++
	+++	+++	+++	++++
	++	++	++	++
Grupo Controle	+++	+++	+++	++
	++++	++++	++++	++++
	+++	+++	+++	+++
	++	++	++	+

7º. Dia de reparação	Maturação			
Animais	1º avaliador	2º. avaliador	3º. avaliador	4º. avaliador
Grupo Teste	++++	+++	+++	++++
	+	+	++	++
	+++	++++	++++	+++
	++++	++++	++++	++++
Grupo Controle	+++	+++	+++	++
	++++	++++	+++	++++
	+++	+++	+++	++++
	+++	++++	+++	++++

10ºDia de reparação	Maturação			
Animais	1º avaliador	2º. avaliador	3º. avaliador	4º. avaliador
Grupo Teste	++++	+++	++++	+++
	+++	+++	++++	++++
	++	++	++	++++
	Excluído	Excluído	Excluído	Excluído
Grupo Controle	++	+	++	+
	+++	+++	++++	+++
	++++	+++	++++	+++
	+++++	++++	++++	++++

Tabela 8 - Variações do remodelamento e maturação, em porcentagem.

REMODELAMENTO E MATURAÇÃO												
Dias	Alto/Muito alto				Moderado				Pouco/Muito pouco			
	Teste	%	Cont.	%	Teste	%	Cont.	%	Teste	%	Cont.	%
3º	0	0	3	18,75	0	0	1	6,25	16	100	12	75
5º	1	6,25	4	25	3	18,75	7	43,75	12	75	5	31,25
7º	8	50	6	37,5	4	25	9	56,25	4	25	1	6,25
10º	5	31,25	7	43,75	4	25	5	31,25	3	18,75	4	25

A tabela oito demonstra a soma dos resultados e o cálculo em porcentagem das alterações na reparação tecidual quanto ao processo de remodelamento e maturação realizado pelos avaliadores, comparando-os entre os grupos teste e controle. Apresentaram atraso do grupo teste nos 3º e 5º dias comparando com o grupo controle, como será demonstrados nos três gráficos a seguir;

REMODELAMENTO E MATURAÇÃO - Alto/Muito Alto

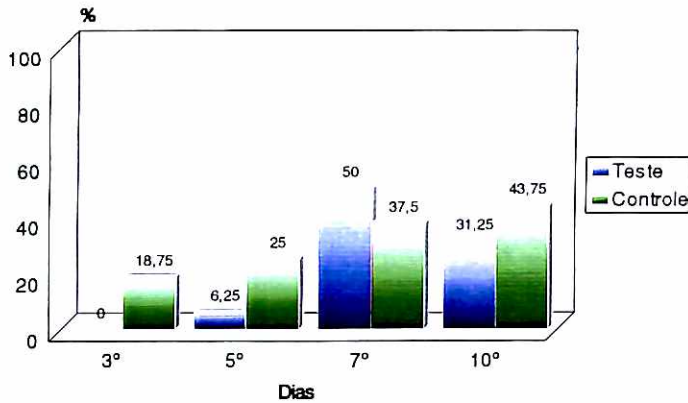


Gráfico13 - Variações de remodelamento e maturação em animais que apresentaram altas taxas em porcentagem

REMODELAMENTO E MATURAÇÃO - Moderado

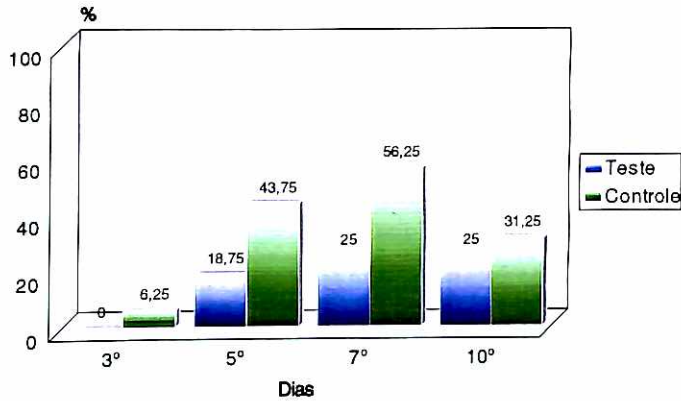


Gráfico 14 - Variações de remodelamento e maturação em animais que apresentaram taxas moderada em porcentagem.

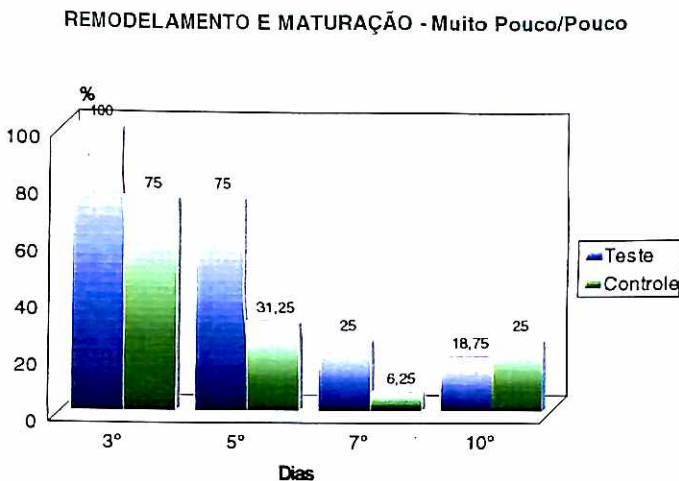


Gráfico 15 - Variações de remodelamento e maturação em animais que apresentaram baixas taxas em porcentagem.

Os gráficos 13; 14 e 15 demonstram atraso no remodelamento e maturação do grupo teste em comparação ao grupo controle nos cinco primeiros dias, porém o grupo teste acompanha o processo de reparação tecidual a partir do sétimo dia similar ao grupo controle.

A tabela a seguir (tabela 9) demonstra os resultados estatísticos do teste de Mann-Whitney U utilizado para comparar duas amostras independentes de animais, comparando as diferenças entre o grupo controle e o grupo teste, nos dez dias de avaliação;

Tabela 9 - Resultado estatístico, onde apresenta a numeração em vermelho significa que existe diferença estatística entre o grupo controle e teste com relação aos quesitos avaliados. Já o resultado em preto significa que não existe diferença estatisticamente significativa entre os grupos teste e controle com relação aos quesitos avaliados.

Quesito avalido	DIAS			
	3°	5°	7°	10°
Neutrófilos	0,0001	0,2770	0,0177	0,0947
Edema	0,0288	0,0001	0,9699	0,0859
Macrófagos	0,7919	0,7345	0,4624	0,9445
Fibroplastia e níveis de colágeno	0,0143	0,1576	0,0382	0,2652
Neovascularização	0,0083	0,0830	0,0237	0,1145
Contração da ferida	0,5095	0,3271	0,3461	0,2186
Reepitelização	0,0059	0,9850	0,7919	0,8345
Remodelamento e maturação	0,0012	0,0185	0,9699	0,9630

Houve diferença estatisticamente significativa para os neutrófilos no 3º e 7º dias do grupo controle, Edema no 3º e 5º dias do grupo controle, Fibroplastia e níveis de colágeno no 3º e 7º dias do grupo controle, Neovascularização no 3º e 7º dias do grupo controle, Reepitelização no 3º dia do grupo controle e Remodelamento e maturação no 3º e 5º dias do grupo teste. Os outros componentes, Macrófagos e Contração da ferida, não apresentaram diferenças. Essa diferença estatística pode traduzir um possível atraso no desenvolvimento dos grupos nestas datas supracitadas. Visualiza lamina histológicas nas figuras 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38 e 39.

A tabela a seguir (tabela 9) demonstra os resultados estatísticos do teste de Kruskal wallis –não paramétrico– utilizado para comparar duas amostras independentes de animais, comparando as diferenças entre o grupo controle e o grupo teste, sem levar em consideração os dias de avaliação, total de unidades amostral 60 do grupo teste –ex-fumante– e 64 do grupo controle;

Tabela 10 - Resultado estatístico, onde apresenta a numeração em vermelho significa que existe diferença estatística entre o grupo controle e teste com relação aos quesitos avaliados. Já o resultado em preto significa que não existe diferença estatisticamente significativa entre os grupos teste e controle com relação aos quesitos avaliados.

Tipos de anomalias	p-valor calculado
Neutrófilos	0,0001
Edema	0,9840
Macrófagos	0,6708
Fibroplastia e níveis de colágeno	0,0458
Neovascularização	0,0213
Contração da ferida	0,2420
Reepitelização	0,3173
Remodelamento e maturação	0,0084

Houve diferença estatisticamente significativa para o neutrófilos, Fibroplastia e níveis de colágeno, Neovascularização apresentando possível melhora no grupo que foi suspenso o hábito de fumar e possível melhora do Remodelamento e maturação no animais que foram expostos ao hábito de fumar durante todo avaliação. Contudo, os

outros componentes, Edema, Macrófagos, Contração da ferida e Reepitelização, não apresentaram diferenças estatísticas.

A tabela a seguir demonstra os resultados estatísticos do teste de Wilcoxon utilizado com o intuito de avaliar evolução e alterações relacionadas ao tempo de 3 à 5 dias e compara-las entre os grupos teste e controle.

Tabela 11 - Resultado estatístico, onde apresenta a numeração em vermelho significa que existe diferença estatística do 3°. ao 5°. Dia de reparação. Já o resultado em preto significa que não existe diferença estatisticamente significativa do 3°. ao 5°. Dia de reparação. O sinal de menos significa a redução do quesito avaliado e o sinal de mais significa o aumento.

Quesito avaliado	p-grupo teste	p-grupo controle
Neutrófilos	-0,0001	+0,0176
Edema	-0,0018	+0,0012
Fibroplastia e níveis de colágeno	+0,0262	0,0734
Neovascularização	0,0734	0,0523
Reepitelização	0,1749	0,1223
Remodelamento e maturação	+0,0033	0,0648

A da tabela 11 condiz com alterações significativas dos quesitos estudados histologicamente, o que sugere a redução gradual dos neutrófilos e edema, com o aumento gradativo dos níveis de fibroplastia, neovascularização, remodelamento e maturação entre o terceiro e o quinto dia de reparação tecidual do grupo teste. Porém neovascularização, e a reepitelização mantiveram-se com crescimento proporcionalmente similar. Já no grupo controle é visível o atraso quanto o aparecimento dos neutrófilos e edema, pois só no quinto dia de reparação eles são evidentes. Demonstrando um a fase importante de regeneração para os grupos apesar do atraso evidente na fase inflamatória no grupo controle.

A tabela 12 demonstra os resultados estatísticos do teste de Wilcoxon utilizado com o intuito de avaliar evolução e alterações de forma comparativa, relacionadas ao tempo entre o 5°. e o 7°. dia depois da obtenção da ferida cirúrgica em ambos os grupos.

Tabela 12 - Resultado estatístico, onde apresenta a numeração em vermelho significa que existe diferença estatística do 5°. ao 7°. Dia de reparação. Já o resultado em preto significa que não existe diferença estatisticamente significativa do 5°. ao 7°. Dia de reparação. O sinal de menos significa a redução do quesito avaliado e o sinal de mais significa o aumento.

Tipos de anomalias	p- grupo teste	p-grupo controle
Neutrófilos	0,548	0,0595
Edema	0,559	-0,0011
Fibroplastia e níveis de colágeno	0,880	1,0000
Neovascularização	0,880	0,9249
Reepitelização	+0,017	+0,0098
Remodelamento e maturação	+0,008	0,1809

O resultado da tabela 12 sugere o aumento significativo dos níveis de reepitelização, remodelamento de maturação entre o quinto e sétimo dia de reparação tecidual do grupo teste. Já no grupo controle apresentou significância na redução do edema e começo da reepitelização. Demonstrando ser um a fase importante de regeneração para ambos os grupos

A tabela 13 demonstra os resultados estatísticos do teste de Wileoxon utilizado, com o intuito de avaliar evolução e alterações relacionadas ao tempo do sétimo ao décimo dia.

Tabela 13 - Resultado estatístico, onde apresenta a numeração em vermelho significa que existe diferença estatística do 7°. ao 10°. Dia de reparação. Já o resultado em preto significa que não existe diferença estatisticamente significativa do 7°. ao 10°. Dia de reparação. O sinal de menos significa a redução do quesito avaliado e o sinal de mais significa o aumento.

Tipos de anomalias	p-grupo teste	p-grupo controle
Neutrófilos	0,7327	0,7630
Edema	0,3653	-0,0037
Fibroplastia e níveis de colágeno	0,0859	0,1317
Neovascularização	+0,0093	0,1468
Reepitelização	0,8892	0,8358
Remodelamento e maturação	0,8892	0,8358

c

O resultado da tabela 13 condiz com alterações significativas dos quesitos estudados histologicamente, traduz a redução o aumento significativo da

neovascularização entre o sétimo e décimo dia de reparação tecidual do grupo teste. Já no grupo controle ainda é visível redução significativa do edema, demonstrando persistência na presença de edema. É extremamente importante observar que o resultado estatístico demonstrados nas tabelas 11, 12 e 13, que não apresentaram alteração estatística significativa não representa involução na reparação, mas que a evolução nestas variáveis foi sutil.

Os dados clínicos e histológicos obtidos do grupo controle composto de ratos *Wistar* não exposto ao hábito de fumar tabaco encontrado e publicado na dissertação de Vitale (2005) foram utilizados como parâmetros de normalidade da reparação tecidual saudável de forma comparativa na discussão dos resultados desta pesquisa.

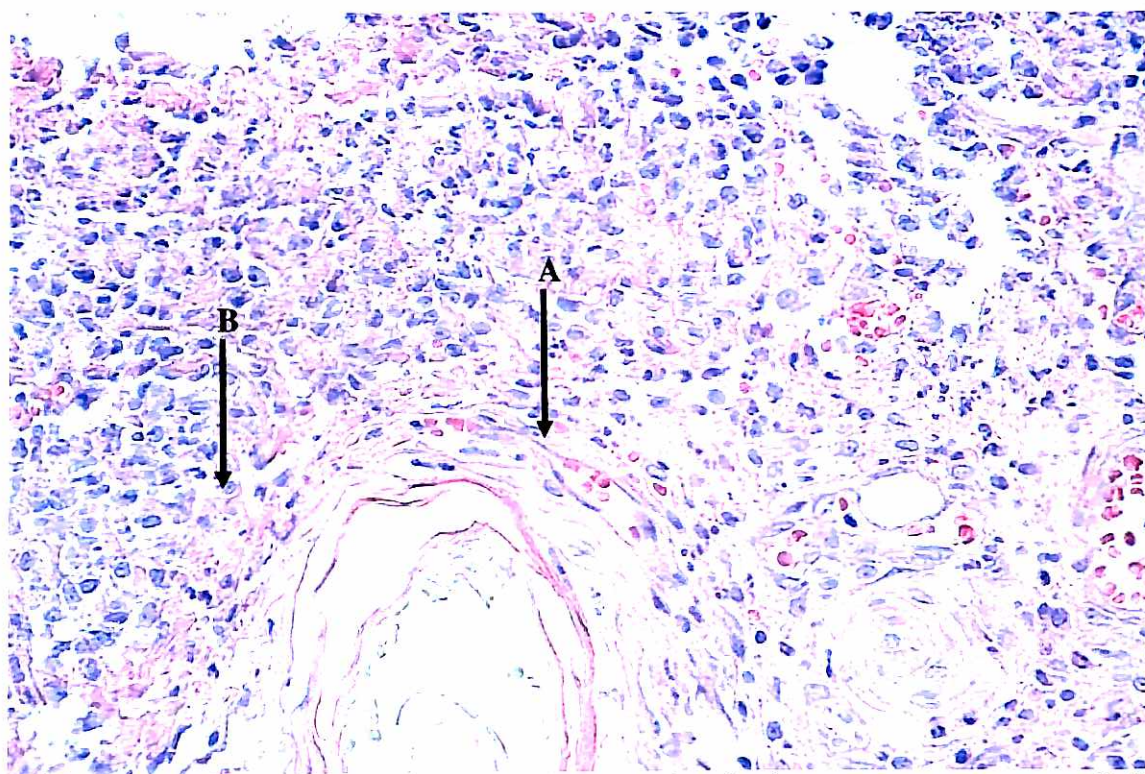


Figura 32 – Regeneração tecidual no terceiro dia do grupo teste, aumento 400X, coloração HE – Na margem inferior observa-se processo de reepitelização (A) com bordo da epiderme acima e baixo e entre eles uma intensa reorganização dermal com inúmeros macrófagos (B).

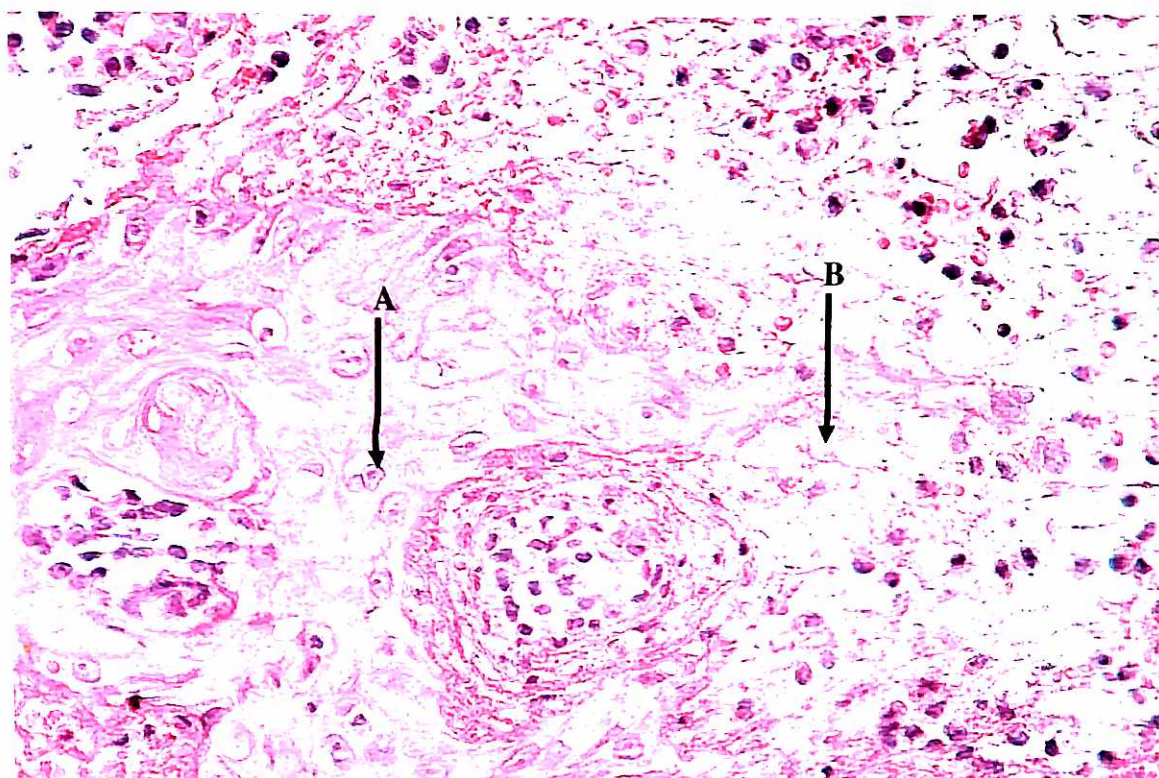


Figura 33 – Regeneração tecidual no terceiro dia do grupo controle, aumento 400X, coloração HE – Presença maciça de infiltrado inflamatório neutrofílico (A) em região de dente frouxa e densa. Fraco de fibroplastia (B).

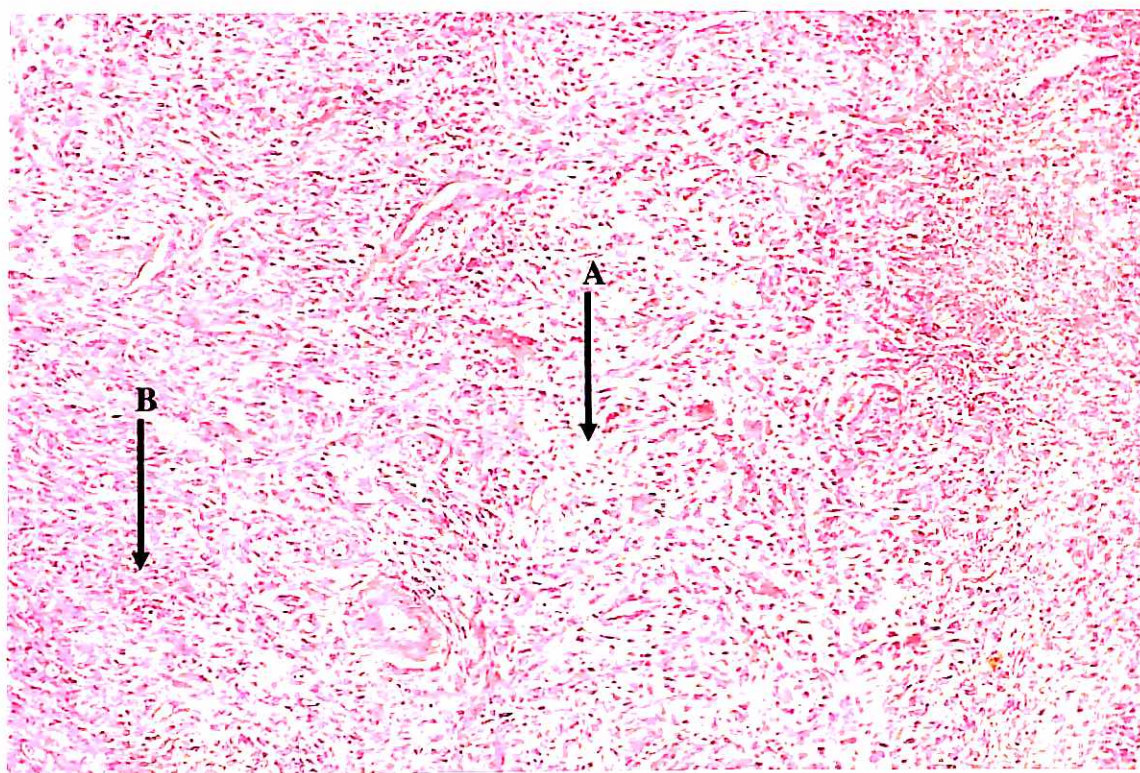


Figura 34 – Regeneração tecidual no quinto dia do grupo teste, aumento 100X, coloração HE - Ausência de epitélio. Fibroplastia (com fibroblastos e macrófagos) e reorganização irregular de fibras de colágeno (A). Há a presença concomitante de infiltrado inflamatório neutrofílico (B).

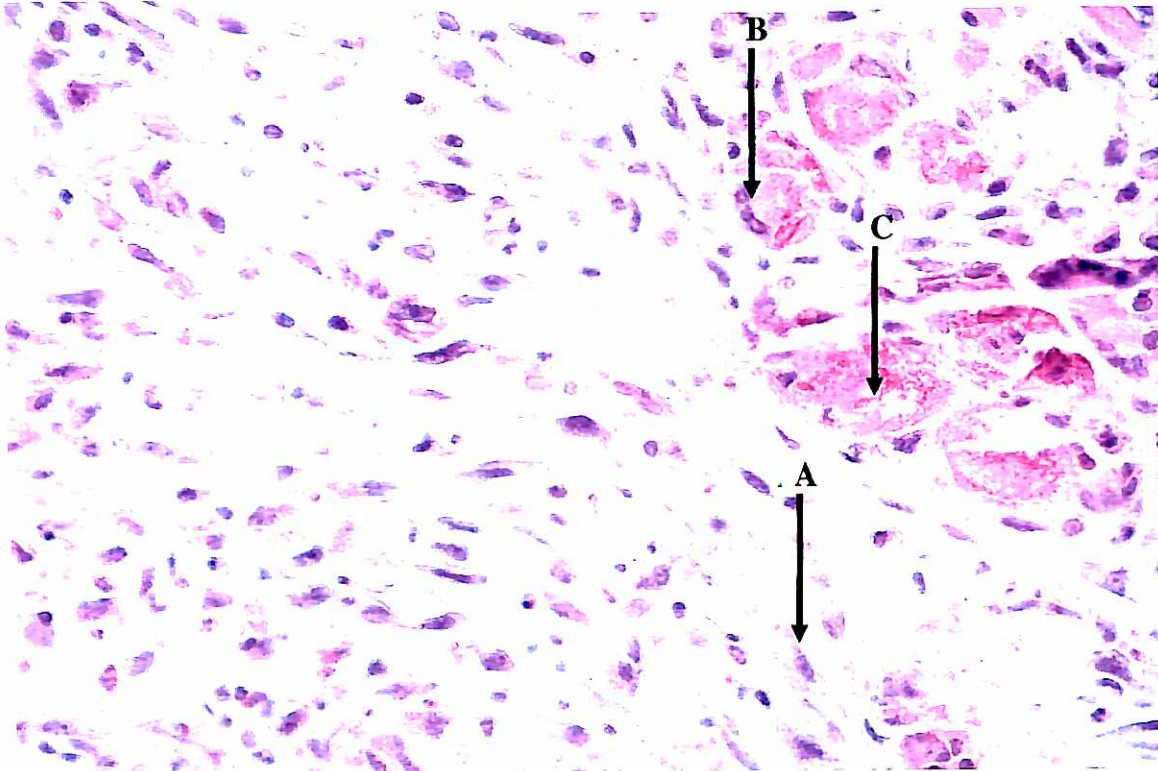


Figura 35 – Regeneração tecidual no quinto dia do grupo controle, aumento 100X, coloração HE - Intensa fibroplastia com inúmeros fibroblastos (A) e macrófagos (B) em derme. Foco hemorrágico na margem esquerda acima (C).

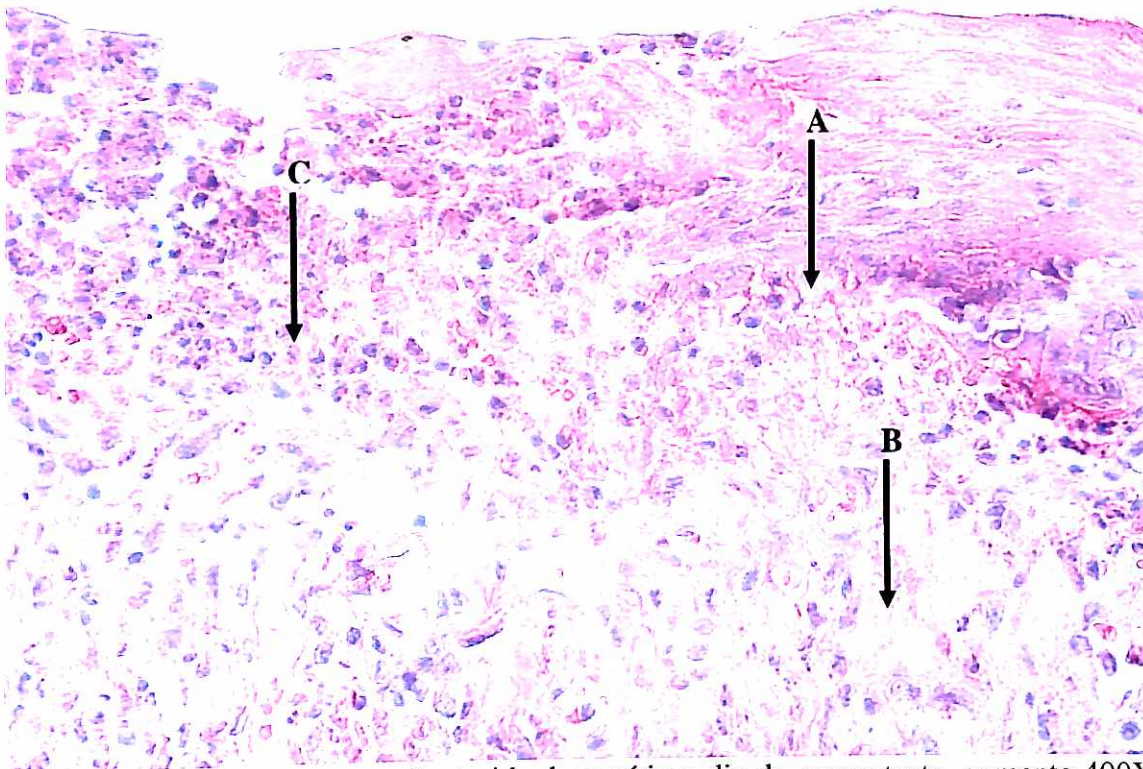


Figura 36 – Regeneração tecidual no sétimo dia do grupo teste, aumento 400X, coloração HE - Foco de reepitelização com proliferação de células basais da epiderme (A) associado á uma boa fibroplastia (B), porém com a presença concomitante de infiltrado inflamatório neutrofílico(C).

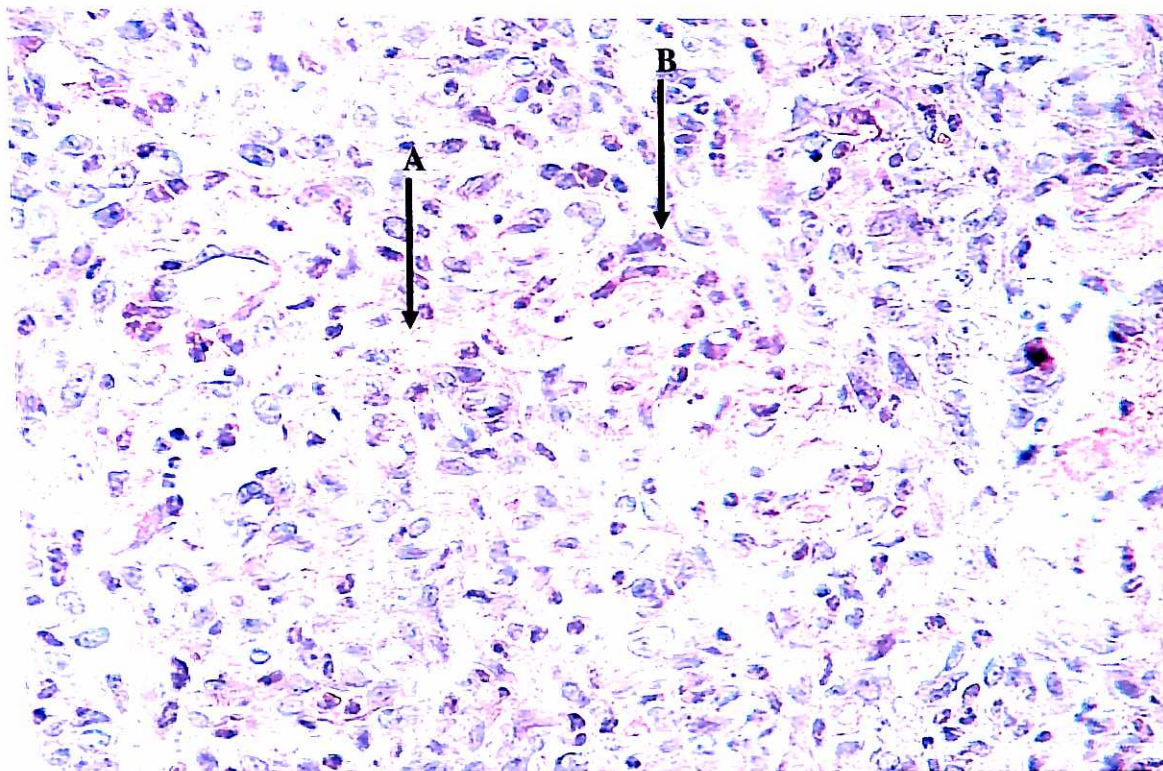


Figura 37 – Regeneração tecidual no sétimo dia do grupo controle, aumento 400X, coloração HE - Fibroplastia dermal inicial(A) com a presença de infiltrado inflamatório neutrofílico(B).

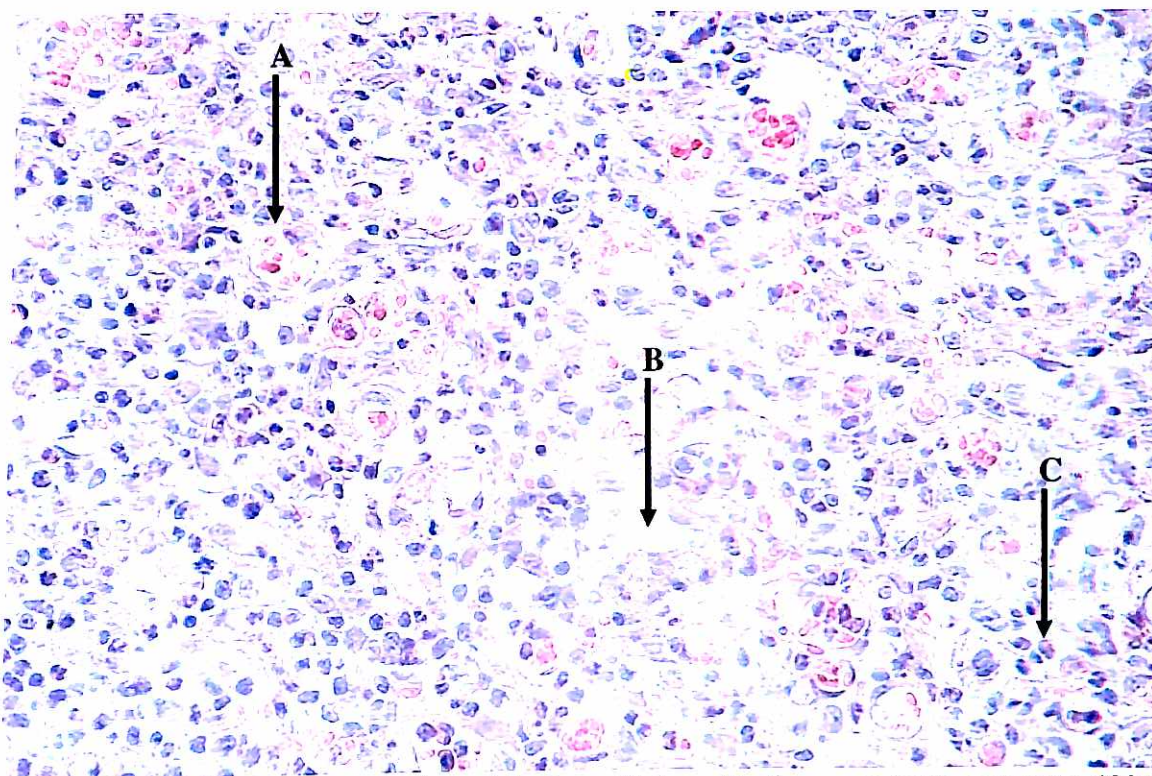


Figura 38 – Regeneração tecidual no décimo dia do grupo teste, aumento 400X, coloração HE - Focos de neovascularização (A) com edema (B) transudativo perifericamente devido a imaturidade dos vasos e infiltrado inflamatório(C).

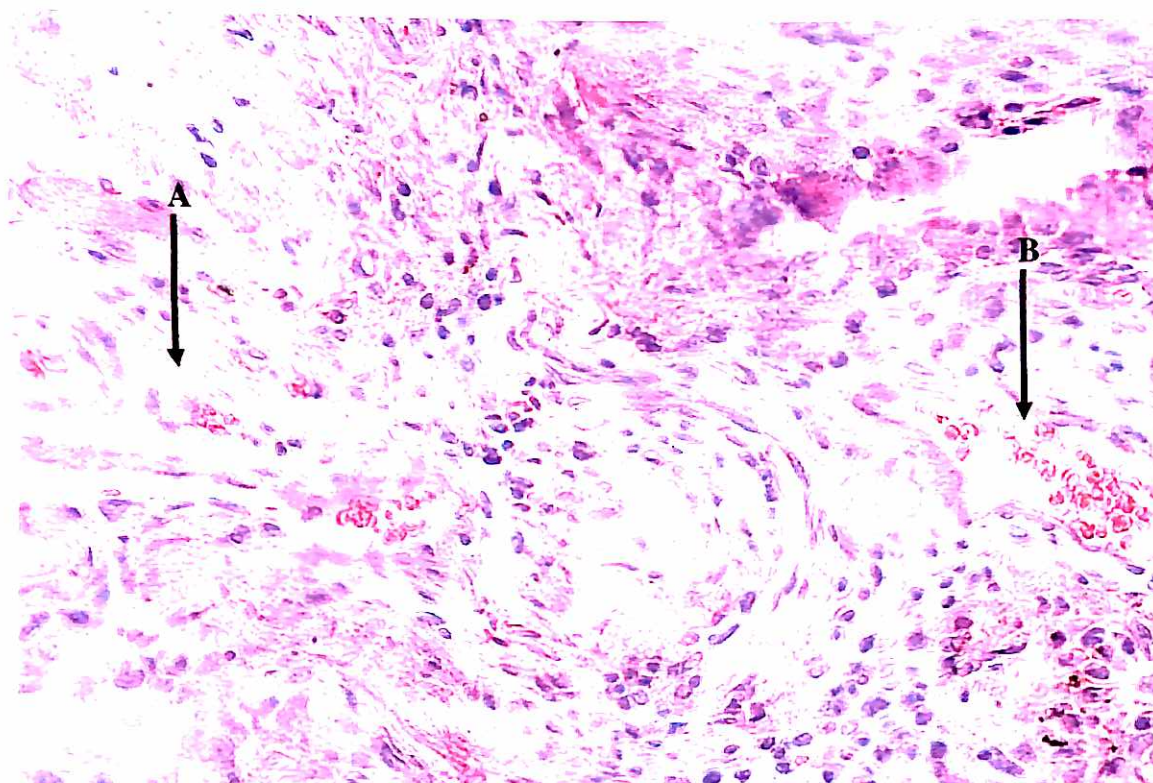


Figura 39 – Regeneração tecidual no décimo dia do grupo controle, aumento 400X, coloração HE - Ausência de células inflamatórias. Boa presença de colágeno (A) em derme e vasos sanguíneos (B).

6 DISCUSSÃO

6.1 Discussão da Metodologia empregada

Na seleção da metodologia a ser empregada nesta avaliação utilizou-se como base a metodologia empregada na pesquisa realizada por Vitale (2005) em sua monografia de defesa de conclusão de mestrado, que confirma viabilidade na utilização do protocolo de expor os animais ao hábito de fumar cigarro utilizado. Confirmado pelo resultado do teste de Carboxi-hemoglobina realizado em sua amostra, com taxa média de 1,66% para os animais expostos ao hábito de fumar e 0,62% nos animais não expostos ao hábito de fumar tabaco. Segundo Shering; Gastwirth(1990), a afinidade de Monóxido de carbono à hemoglobina é 200 vezes maior que a do oxigênio, portanto é a principal substância deletéria na fase gasosa, inibindo a capacidade da hemoglobina de carrear o oxigênio. Normalmente, o monóxido de carbono é absorvido e então convertido para carboxi-hemoglobina, Mosley; Finsenth (1978) afirmam que para humanos serem considerados como “fumantes”, apresentam taxa de carboxi-hemoglobina entre 1 a 20%. Já Lawrence *et al.* (1984) relataram que no teste de carboxi-hemoglobina realizado no grupo teste –exposto ao fumo – apresentaram taxas mais altas de 8,4%-16,2% em comparação ao grupo controle – não-exposto – 0% à 2%.

Considerando a metodologia utilizada por Vitale (2005), Assis *et al.* (2005) e César-Neto (2006), similar a dessa avaliação, onde os resultados apresentaram alterações metabólicas como também alteração na regeneração tecidual do grupo exposto ao hábito de fumar, pode-se considerar que o método de indução ao fumo aqui utilizado apresentou-se eficaz.

Assim como foi citado por Lawrence (1997), que os ratos demonstravam fobia à exposição da fumaça do cigarro do início ao fim da pesquisa, os ratos nesta avaliação

também se portaram da mesma forma, e essa afirmação é persistente pelo fato da possível indução ao estresse aos animais expostos ao hábito de fumar.

6.2 Discussão dos Achados Clínicos.

Através da avaliação dos achados clínicos das amostras, no ato do sacrifício dos animais, foram observados quatro fatores importantes do processo de regeneração por segunda intenção da ferida cirúrgica: presença de infecção, perímetro da lesão e edema tardio e alterações de coloração. Todos graduados por um único profissional, previamente calibrado, como: boa, moderada e ruim.

Em diferentes áreas da saúde é geralmente aceito o fato de que o fumo atrapalha a regeneração tecidual (MOSELY *et al.* 1978; SWEET; BUTLER 1979; LAWRENCE *et al.* 1984; SIANA *et al.* 1989; JENSEN *et al.* 1991; KNUUTINEN *et al.* 2002; PREBER; BERGSTÖM; LINDER *et al.* 1992; WONG *et al.* 2004; FANG; SVOBODA 2005; KURI *et al.* 2005, VITALE 2005).

Ao relacionar as cirurgias na cavidade oral, Sweet; Butler (1979) apresentaram um aumento na incidência de alevolite pós exodontias em fumantes e relataram o fumo com um impedimento para cirurgia de enxertia tecidual mole em cobertura radicular de dentes. Jones; Triplett (1992) comentaram a experiência dos cirurgiões quanto a maior incidência de infecção e deiscência nos pacientes fumantes. Da mesma forma foi encontrado, num animal do grupo controle desta avaliação, acentuado retardo regenerativo, relacionado a presença de exudato purulento e infecção. Portanto, a infecção na região do processo regenerativo é um importante fator degenerativo local, e sua ausência é imprescindível para possibilitar a regeneração.

A migração celular é a chave para o sucesso no processo de regeneração, que é regulado por uma variedade de sinalizadores. As células epiteliais nas bordas do

ferimento começam a migrar e proliferar em direção à área desnudada; essa migração celular é necessária para reepitilização do ferimento (FANG; SVOBODA 2005). Em uma pesquisa similar, Lawrence *et al.* (1984) citaram um retardo regenerativo em ferimentos cirúrgicos em dorso de ratos expostos ao hábito de fumar. Siana *et al.* (1989) avaliaram contração e perímetro das lesões a título de sinalizar o grau de regeneração tecidual e apresentaram alterações cicatriciais em pacientes fumantes que foram submetidos a laparotomia.

Vitale (2005) encontrou clinicamente retardo regenerativo de ferimento em maxila no grupo teste que foi exposto ao hábito de fumar cigarro, resultado este similar ao encontrado em ambos os grupos investigados nesta pesquisa, principalmente no grupo exposto a fumaça durante todo processo de regeneração tecidual. Porém apesar da expectativa da melhora na regeneração tecidual da amostra que foi submetida à ferida cirúrgica após a suspensão do fumo, não foi encontrado valores estatísticos significativos de melhora quanto à avaliação clínica, quando comparado ao grupo exposto ao fumo durante todo o experimento. Sherwin; Gastwirth (1990) e Knuutinen (2002) associaram estas alterações clínicas à vasoconstrição periférica ocasionada pelo tabaco e ao alto grau de isquemia tecidual, que pode ser crítico, levando ao retardamento da epitelização.

6.3 Discussão dos Achados Histológicos.

A análise histológica ofereceu melhores parâmetros de avaliação comparativa entre os grupos do que a avaliação clínica.

Na fase inflamatória – fase inicial – foi avaliada presença de neutrófilos e macrófagos importantes para obtenção de fagocitose interna de debris. Nociti *et al.* (2000) relacionaram a inibição dos neutrofilos, monócitos e função microbiota à

exposição de nicotina. Foi bem evidente nesta pesquisa, no grupo teste –ex-fumante– o acentuado número de neutrófilos nos três primeiros dias no grupo teste, com decréscimo regular durante o passar dos dias –aproximado a parâmetros de regeneração normais –, porém, o grupo controle manteve a quantidade de neutrófilos moderada e baixa durante todo o processo regenerativo avaliado.

Güntsch *et al.* (2006) ao averiguarem a função dos neutrófilos polimorfo nucleares em placa de fumantes e não-fumantes encontraram um maior número de neutrófilos polimorfo nucleares nos subgrupos de fumantes leve e moderado, porém, houve uma redução da sua viabilidade e função; já o grupo de fumantes severo, apresentou uma redução do número, viabilidade e função relacionados à redução da capacidade de adesão dos neutrófilos polimorfo nucleares, em comparação ao grupo controle.

A contagem de macrófagos em ambos os grupo desta avaliação, apresentou-se relativamente média e similar nos dez dias, demonstrando sutil atraso em ambos os grupos. Mariggiò *et al.* (2001), acreditaram que a persistência dos neutrófilos e macrófagos numa fase secundária, relacionados à presença de nicotina, pode oferecer um fator interessante para o balanço fisiológico que demanda evolução e resolução de uma inflamação persistente, encontrada em fumantes.

A nicotina participa na interferência da capacidade proliferativa dos eritrócitos percuissores e eritrócitos maduros, bem como dos fibroblastos e dos macrófagos.(SHERWIN; GASTWIRTH, 1990). Esta pode ser uma justificativa para a persistência dos macrófagos por um longo período na resposta regenerativa.

Quanto à presença de edema, foi encontrado um moderado edema, principalmente na fase inicial do grupo teste – três primeiros dias –, com redução gradativa. Já no grupo controle, o edema apresentou-se mais tardio e manteve-se

persistente durante todo experimento. Portanto, esse edema transudativo moderado persistente do grupo controle pode ser considerado comum, e foi provavelmente ocasionado devido à imaturidade de vasos neoformados ou à redução na atividade dos neutrófilos e macrófagos.

A migração celular é essencial para o processo de regeneração e é regulado por uma variedade de sinalizadores Fang; Svoboda (2005) estudaram a reação de alguns desses sinalizadores necessários para a migração dos fibroblastos e encontraram distúrbios em diferentes proteínas relacionadas a nicotina. O estudo demonstrou que os fibroblastos, na presença de nicotina, reduziram até 50% de sua migração, e a alteração identificada nos sinalizadores pode ser importante na modulação, como também pode ser reguladora do processo de regeneração de ferimentos orais em pacientes que fumam.

Wong *et al.* (2004) encontraram em seu experimento redução na capacidade adesiva dos fibroblastos, ocasionando um decréscimo na migração celular. Fumantes passivos estimulam as proteínas, prolongam a sobrevivência celular dos fibroblastos e inibem sua migração; esse processo pode resultar no atraso do reparo e remodelamento, levando a uma cicatriz indesejada, como é comum em indivíduos fumantes.

Nesta pesquisa, a presença de fibroblastos e níveis de colágenos nos resultados foram aproximados em ambos os grupos, porém o grupo controle apresentou sutil atraso na presença de fibroblastos em comparação ao grupo teste. Hanes *et al.* (1991) relataram que o efeito da nicotina sobre o fibroblasto tem alterado sua morfologia e adesão a substratos, como também distúrbios da síntese e secreção de proteínas, esta alteração funcional pode estar associada com as mudanças na membrana celular, resultado na adesão da nicotina. Nociti *et al.* (2000) demonstra a inibição da nicotina junto ao crescimento dos fibroblastos gengivais e decréscimo da atividade da

colagenase. Apesar de avaliar a quantidade de fibroblastos presentes, nesta pesquisa não foi estudado alterações quanto à função e forma dos fibroblastos.

Tripton; Dabbous (1995) encontraram redução na proliferação de fibroblastos e fibronectina, como também produção e quebra do colágeno tipo I. Estes autores sugerem que a nicotina associada ao uso do fumo de cigarro resulta no incremento da destruição da matriz extracelular gengival, na presença da doença periodontal. Tripton; Mustafa (1995) demonstraram que baixas concentrações de nicotina tiveram efeito estimulatório na multiplicação de fibroblastos, enquanto que as altas concentrações de nicotina tiveram efeito deletério na multiplicação de fibroblastos.

Para obtenção de melhores resultados quanto ao número e função de fibroblastos e níveis de colágeno, talvez fosse interessante um período maior de suspensão ao fumo. Knuutinen *et al.* (2002) comentaram que o decréscimo na síntese do colágeno no mecanismo de resistência e estabilidade da pele não está esclarecido, porém fumantes severos têm demonstrado sofrimento tecidual por hipóxia, durante a maior parte do dia, e esse longo período de hipóxia e toxicidade afeta os fumantes. A hipóxia pode ter ocasionado efeitos deletérios sobre o grupo controle, o que nesta avaliação, não se justifica no grupo teste. Chang *et al.* (2002) observaram o efeito da citotoxicidade da nicotina nos fibroblastos, e deixou bem claro que o cigarro possui mais de 2000 substâncias tóxicas, e a melhor opção de tratamento ainda seria a suspensão do hábito.

A isquemia é um fator importante na fisiopatologia imposta na regeneração. O hábito de fumar cigarro tem o efeito direto no tecido exposto, como também na redução da perfusão e distribuição do oxigênio no organismo (REUZ *et al.* 1984; SHERWIN; GASTWIRTH 1990; JENSEN *et al.* 1991; JONES; TRIPLETT 1992, VITALE 2005). Reuz *et al.* (1984) obtiveram em sua avaliação decréscimo do diâmetro interno dos vasos de até 92,9% e o retorno a sua normalidade depois de aproximadamente dez

minutos. Já Jensen *et al.* (1991) demonstraram uma redução significativa do nível de oxigênio nos tecidos subcutâneos em oito voluntários, que permaneceu baixo durante 30 a 50 minutos após o fumo de um único cigarro.

Sweet; Butler (1979) comentaram os efeitos resultantes dos produtos do cigarro, que interferem na agregação plaquetária, formação de trombo e resistência do coagulo, fragilizando a permeabilidade vascular e retardando a regeneração tecidual. Quanto à avaliação da capacidade de recuperação vascular, foi aqui demonstrado através dos resultados que ambos os grupos encontrava-se um pouco atrasados. Contudo, acredita-se que o grupo teste apresentou melhores taxas de neovascularização do 7º ao 10º dia do que o grupo controle. Ribel *et al.* (1995) relataram que a descontinuidade de fumar antes da cirurgia de enxerto ósseo é justificada, pois o hábito de fumar pode atrapalhar a regeneração óssea, devido ao fato do atraso no crescimento da vascularização no osso enxertado nos animais expostos a nicotina.

A redução na circulação periférica causada pelo retardo na neovascularização – como encontrado nos achados histológicos – possivelmente dificultou a troca de compostos celulares, e pode ser uma justificativa adicional relacionada ao atraso na resposta regenerativa na região lesada nesta avaliação.

A aproximação das margens da ferida, que ocorre no final do processo regenerativo decorrente da ação dos miofibroblastos foi evidenciada nesta pesquisa, de forma moderada em ambos os grupos. O grupo teste iniciou o processo de contração primeiro que o controle, porém este compensou o processo aumentando o número de miofibroblastos do 7º ao 10º dia.

Ao avaliar o processo de reepitelização, nesta pesquisa, encontrou-se resultados bem aproximados nos dois grupos, mais acentuados no sétimo e décimo dia. Já Wong *et al.* (2004) em suas cobaias expostas ao fumo obtiveram 85% de tecido cicatrizado em

comparação a 95% no grupo de cobaias não expostas ao fumo, demonstrando que a regeneração tecidual pode ser significativamente atrasada e na avaliação microscópica observou-se celularidade e deposição de matriz anormal.

Kuri *et al.* (2005), encontraram uma baixa incidência no dano regenerativo em ex-fumantes recentes, intermediários e não fumantes em comparação aos fumantes. Portanto, o estudo sugere a importância da suspensão ao fumo prévio a cirurgia, que pode resultar na melhora da regeneração e funcionar também como uma boa recomendação, com o intuito de encorajar os pacientes a deixar o fumo. Também demonstraram que a porcentagem de cigarros consumidos não teve significância na relação entre a suspensão do fumo e a regeneração tecidual. Os riscos de complicações começaram a apresentar redução nos grupos que param de fumar de uma a quatro semanas antes da cirurgia, decaindo os riscos naqueles que haviam parado há mais tempo. Os resultados encontrados nesta pesquisa apresentaram diferença significativa na fase inicial da reparação a fase inflamatória, fase esta associada do 1º. Ao 5º dia de reparação, pois os animais fumantes apresentaram atraso quando comparado com o grupo de animais ex-fumantes. Quanto a fase final, fibroblástica, diferentemente dos resultados dos encontrados pelos autores supracitados, os resultados aqui encontrados não apresentaram diferença significativa entre os grupos de fumantes e ex-fumantes, portanto talvez o período de uma semana – que equivale aproximadamente a um mês no ser humano – não foi suficiente para obtenção de melhora substancial no processo regenerativo.

Foi encontrado um atraso no remodelamento da região lesada de ambos os grupos, mais uma vez, sugerindo que o hábito de fumar cigarro é danoso no processo regenerativo e na fase de contração e remodelamento. Apesar da expectativa da

melhora substancial no grupo ex-fumante, a diferença entre os grupos avaliados foi sutil.

Ademais, essa dissertação visa orientar corretamente o paciente a respeito de como proceder durante o período pré e pós-cirúrgico a fim de se obterem melhores resultados estético-funcionais dos tecidos intra-orais submetidos à instalação de implantes dentários - dentre outras cirurgias que também envolvam a mucosa oral. Os resultados poderiam ser utilizados como estímulo substancial ao paciente na tentativa de tratamento do hábito de fumar cigarros.

O cirurgião-dentista, como profissional da área de saúde não pode se furta à responsabilidade de motiva e, principalmente, alertar o paciente para os malefícios do tabagismo (SENDYK *et al.*, 2006)

CONCLUSÃO

1. Não houve diferença na avaliação clínica dos grupos estudados – controle e teste –.
2. Na avaliação histológica foi observado atraso significativo da fase inflamatória de regeneração –fase inicial– no grupo controle, exposto ao hábito de fumar por todo processo de avaliação, porém na fase fibroblástica –fase final– não houve diferença significativa entre os grupos.
3. Sugere-se que o período de suspensão do hábito de fumar em ratos *Wistar* –equivalente a um mês em humanos– foi curto e provavelmente um maior período de suspensão do fumo pré-operatório poderá apresentar melhor evolução na reparação tecidual em sua fase final de reparação.

REFERÊNCIAS*

- AH, M. K.; JOHNSON, G. K.; KALDAHL, W. B.; PATIL, K. D.; KALKWARF, K. L.. The effect of smoking on the response to periodontal therapy. J Clin Periodontol, v.21, n.2, p.91-7, Feb. 1994.
- AL-SHAMMARI, K. F; MOUSSA, M. A.; AL-ANSARI, J. M.; AL-DUWAIRY, Y. S.; HONKALA, E. J.. Dental patient awareness of smoking effects on oral health: Comparison of smokers and non-smokers. J Dent, v.34, n.3, p.173-8, Mar. 2006.
- ASSIS, G. F.; CEOLIN, D. S.; MARQUES, M. E.; SALVADORI, D. M.; RIBEIRO, D. A. Cigarette Smoke Affects Apoptosis in Rat Tongue Mucosa: Role of bcl-2 Gene Family. J Mol Histol, v.36, n.8-9, p.483-9, Oct, 2005.
- BAIN, C. A.; MOY, P. K. The association between the failure of dental implants and cigarette smoking. Int J Oral Maxillofac Implants, v.8, n.6, p.609-15, 1993.
- BENATTI, B. B.; CESAR-NETO, J. B.; GONCALVES, P. F.; SALLUM, E. A.; NOCITI, F. H., Jr. Smoking affects the self-healing capacity of periodontal tissues. A histological study in the rat. Eur J Oral Sci, v.113, n.5, p.400-3. 2005.
- PREBER, H.; BERGSTRÖM, J.; LINDER L. E.; P. Occurrence of periopathogens in smoker and non-smoker patients. J Clin. Periodontol. v.19, p.667-71. 1992
- CAMPBELL, H. S; SIMPSON, E. H.; PETTY, T. L.; JENNETT, P. A.. Addressing oral disease--the case for tobacco cessation services. J Can Dent Assoc; v.67, n.3, p.141-4, Mar. 2001.
- CESAR-NETO, J. B.; BENATTI, B. B.; SALLUM, E. A.; CASATI, M. Z.; NOCITI, F. H., JR. The influence of cigarette smoke inhalation and its cessation on the tooth-supporting alveolar bone: a histometric study in rats. J Periodontal Res, v.41, n.2, p.118-23, Apr. 2006.
- CHANG, Y. C.; HUANG, F. M.; TAI, K. W.; YANG, L. C.; CHOU, M. Y. Mechanisms of cytotoxicity of nicotine in human periodontal ligament fibroblast cultures in vitro. J Periodontal Res, v.37, n.4, p.279-85, Aug. 2002.
- DE BRUYN, H.; COLLAERT, B. The effect of smoking on early implant failure. Clin Oral Implants Res, v.5, n.4, p.260-4, Dec. 1994.
- FANG, Y.; SVOBODA, K. K. Nicotine inhibits human gingival fibroblast migration via modulation of Rac signalling pathways. J Clin Periodontol, v.32, n.12, p.1200-7, Dec. 2005.
- GUNTSCH, A.; ERLER, M.; RESHAW, P. M.; GUSCH, B. W.; KLINGER, G.; GLOCKMANN, E.. Effect of smoking on crevicular polymorphonuclear neutrophil function in periodontally healthy subjects. J Periodontal Res, v.41, n.3, p.184-8. Jun, 2006.

* Normalizada de acordo com a NBR 6023/2002 – ABNT.

REFERÊNCIAS*

- AH, M. K.; JOHNSON, G. K.; KALDAHL, W. B.; PATIL, K. D.; KALKWARF, K. L.. The effect of smoking on the response to periodontal therapy. J Clin Periodontol, v.21, n.2, p.91-7, Feb. 1994.
- AL-SHAMMARI, K. F; MOUSSA, M. A.; AL-ANSARI, J. M.; AL-DUWAIRY, Y. S.; HONKALA, E. J.. Dental patient awareness of smoking effects on oral health: Comparison of smokers and non-smokers. J Dent, v.34, n.3, p.173-8, Mar. 2006.
- ASSIS, G. F.; CEOLIN, D. S.; MARQUES, M. E.; SALVADORI, D. M.; RIBEIRO, D. A. Cigarette Smoke Affects Apoptosis in Rat Tongue Mucosa: Role of bcl-2 Gene Family. J Mol Histol, v.36, n.8-9, p.483-9, Oct, 2005.
- BAIN, C. A.; MOY, P. K. The association between the failure of dental implants and cigarette smoking. Int J Oral Maxillofac Implants, v.8, n.6, p.609-15, 1993.
- BENATTI, B. B.; CESAR-NETO, J. B.; GONCALVES, P. F.; SALLUM, E. A.; NOCITI, F. H., Jr. Smoking affects the self-healing capacity of periodontal tissues. A histological study in the rat. Eur J Oral Sci, v.113, n.5, p.400-3. 2005.
- PREBER, H.; BERGSTRÖM, J.; LINDER L. E.; P. Occurrence of periopathogens in smoker and non-smoker patients. J. Clin. Periodontol. v.19, p.667-71. 1992
- CAMPBELL, H. S; SIMPSON, E. H.; PETTY, T. L.; JENNETT, P. A.. Addressing oral disease--the case for tobacco cessation services. J Can Dent Assoc, v.67, n.3, p.141-4, Mar. 2001.
- CESAR-NETO, J. B.; BENATTI, B. B.; SALLUM, E. A.; CASATI, M. Z.; NOCITI, F. H., JR. The influence of cigarette smoke inhalation and its cessation on the tooth-supporting alveolar bone: a histometric study in rats. J Periodontal Res, v.41, n.2, p.118-23, Apr. 2006.
- CHANG, Y. C.; HUANG, F. M.; TAI, K. W.; YANG, L. C.; CHOU, M. Y. Mechanisms of cytotoxicity of nicotine in human periodontal ligament fibroblast cultures in vitro. J Periodontal Res, v.37, n.4, p.279-85, Aug. 2002.
- DE BRUYN, H.; COLLAERT, B. The effect of smoking on early implant failure. Clin Oral Implants Res, v.5, n.4, p.260-4, Dec. 1994.
- FANG, Y.; SVOBODA, K. K. Nicotine inhibits human gingival fibroblast migration via modulation of Rac signalling pathways. J Clin Periodontol, v.32, n.12, p.1200-7, Dec. 2005.
- GUNTSCH, A.; ERLER, M.; RESHAW, P. M.; GUSCH, B. W.; KLINGER, G.; GLOCKMANN, E.. Effect of smoking on crevicular polymorphonuclear neutrophil function in periodontally healthy subjects. J Periodontal Res, v.41, n.3, p.184-8. Jun, 2006.

* Normalizada de acordo com a NBR 6023/2002 – ABNT.

HABER, J.; WATTLES, J.; CROWLEY, M.; MANDELL, R.; JOSHIPURA, K.; KENT, R. L. Evidence for cigarette smoking as a major risk factor for periodontitis. J Periodontol, v.64, n.1, p.16-23, Jan, 1993.

HANES, P. J.; SCHUSTER, G. S.; LUBAS, S.. Binding, uptake, and release of nicotine by human gingival fibroblasts. J Periodontol, v.62, n.2, p.147-52, Feb, 1991.

JENSEN, J. A.; GOODSON, W. H.; HOPF, H. W.; HUNT, T. K. Cigarette smoking decreases tissue oxygen. Arch Surg, v.126, n.9, p.1131-4, Sep. 1991.

JONES, J. K. e R. G. TRIPLET. The relationship of cigarette smoking to impaired intraoral wound healing: a review of evidence and implications for patient care. J Oral Maxillofac Surg, v.50, n.3, p.237-9; Mar. 1992.

KNUUTINEN, A., N.; KOKKONEN, N.; RISTELI, J.; VAHAKANGAS, K.; KALLIOINEN, M.; SALO, T.; SORSA, T.; OIKARINEN, A.. Smoking affects collagen synthesis and extracellular matrix turnover in human skin. Br J Dermatol, v.146, n.4, p.588-94, Apr. 2002.

KURI, M.; NAKAGAWA, M.; TANAKA, H.; HASUO, S.; KISHI, Y.. Determination of the duration of preoperative smoking cessation to improve wound healing after head and neck surgery. Anesthesiology, v.102, n.5, p.892-6, May, 2005.

LAWRENCE, W. T.; MURPHY, R. C.; ROBSON, M. C.; HEGGERS, J. P. The detrimental effect of cigarette smoking on flap survival: an experimental study in the rat. Br J Plast Surg, v.37, n.2, p.216-9, Apr. 1984

MARIGGIO, M. A.; GUIDA, L.; LAFORGIA, A.; SANTACROCE, R.; CURCI, E.; MONTEMURRO, P.; FUMARULO, R. Nicotine effects on polymorphonuclear cell apoptosis and lipopolysaccharide-induced monocyte functions. A possible role in periodontal disease? J Periodontal Res, v.36, n.1, p.32-9, Feb. 2001.

MENEZES, A.; PALMA, E.; HOLTHAUSEN, R.; OLIVEIRA, R.; OLIVEIRA, P. S.; , E.; STEINHAUS, L.; HORTA, B.; VICTORA, C. G. [Smoking time evolution among medical students, 1986, 1991, 1996]. Rev Saude Publica, v.35, n.2, p.165-9, Apr. 2001.

MOSELY, L. H.; FINSETH, F; GOODY, M. Nicotine and its effect on wound healing. Plast Reconstr Surg, v.61, n.4, p.570-5, Apr. 1978.

NEHER, G. H. Nicotine-induced depression of lymphocyte growth. Toxicol Appl Pharmacol, v.27, n.2, p.253-8, Feb. 1974.

NOCITI, F. H.; NOGUEIRA-FILHO, G. R.; PRIMO, M. T.; MACHADO, M. A.; TRAMONTINA, V. A.; BARROS, S. P.; SALLUM, E. A. The influence of nicotine on the bone loss rate in ligature-induced periodontitis. A histometric study in rats. J Periodontol, v.71, n.9, p.1460-4, Sep, 2000.

REUS, W. F.; ROBSON, M. C.; ZACHARY, L.; HEGGERS, J. P. Acute effects of tobacco smoking on blood flow in the cutaneous micro-circulation. Br J Plast Surg, v.37, n.2, p.213-5, Apr. 1984.

RIEBEL, G. D.; BODEN, S. D.; WHITESIDES, T. E.; HUTTON, W. C. The effect of nicotine on incorporation of cancellous bone graft in an animal model. Spine, v.20, n.20, p.2198-202, Oct. 1995.

SANDHU, H. S. A practical guide to tobacco cessation in dental offices. J Can Dent Assoc, v.67, n.3, p.153-7, Mar. 2001.

SCHWARTZ-ARAD, D.; SAMET, N.; SAMET, N.; MAMLIDER, A.. Smoking and complications of endosseous dental implants. J Periodontol, v.73, n.2, , p.153-7, Feb. 2002.

SENDYK, W. R.; LOWCZYK, D. J.; JAHN R. S.; SENYK, C.L.. Colocação de Implantes em Pacientes Fumantes. In: (Ed.). A atuação Clínica Baseada em Evidências Científicas. São Paulo: Artes Médicas, v.2, 2005. Colocação de Implantes em Pacientes Fumantes, p.89-99.

SWEET, J. B.; BUTLER D. P. The relationship of smoking to localized osteitis. J Oral Surg, v.37, n.10, p.732-5, Oct. 1979.

SHERWIN, M. A; GASTWIRTH, C. M.. Detrimental effects of cigarette smoking on lower extremity wound healing. J Foot Surg, v.29, n.1, p.84-7, Jan/Feb. 1990.

SIANA, J. E.; REX, S.; GOTTRUP, F.. The effect of cigarette smoking on wound healing. Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg, v.23, n.3, p.207-9. 1989.

SIMANI, A. S.; INOUE, S.; HOGG, J. C.. Penetration of the respiratory epithelium of guinea pigs following exposure to cigarette smoke. Lab Invest, v.31, n.1, p.75-81. Jul. 1974.

STOLTENBERG, J. L.; OSBORN, J. B.; PIHLSTROM, B. L.; HERZBERG, M. C.; AEPPLI, D. M.; WOLFF, L. F.; FISCHER, G. E. Association between cigarette smoking, bacterial pathogens, and periodontal status. J Periodontol, v.64, n.12, p.1225-30, Dec. 1993.

TIPTON, D. A; DABBOUS, M. K.. Effects of nicotine on proliferation and extracellular matrix production of human gingival fibroblasts in vitro. J Periodontol, v.66, n.12, p.1056-64, Dec. 1995.

VITALE, Marcelo. Avaliação clínica e histológica da regeneração da mucosa bucal em ratos inducidos ao fumo. 2005. 81f Dissertação (Mestrado em Implantodontia) – Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade de Santo Amaro, São Paulo, 2005.

WANG, X. D.; LIU, C.; BRONSON, R. T.; SMITH, D. E.; KRINSKY, N. I.; RUSSELL, M.. Retinoid signaling and activator protein-1 expression in ferrets given beta-carotene supplements and exposed to tobacco smoke. J Natl Cancer Inst, v.91, n.1, p.60-6, Jan. 1999.

WONG, L. S.; GREEN, H. M.; FEUGATE, J. E.; YADAV, M.; NOTHNAGEL, E. A.; MARTINS-GREEN, M. Effects of "second-hand" smoke on structure and function of fibroblasts, cells that are critical for tissue repair and remodeling. BMC Cell Biol, v.5, p.13, Apr. 2004.

ANEXO A



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP



UNIVERSIDADE DE SANTO AMARO
Comitê de Ética em Pesquisas
Registro CONEP n.º 306
Aprovado em 16/05/2000

PARECER N.º 141/2005

REGISTRO CEP UNISA N.º 282/05

Projeto de Pesquisa "Avaliação da cicatrização do tecido mole bucal em ratos após suspensão da indução ao fumo"

Responsáveis: Pós-graduando: Rodrigo Paiva de Autran Nunes

Orientador: Prof. Dr. Paulo José Bordini

Área Temática Especial: Análises Clínicas

Prezado Pesquisador:

Ao se proceder à análise do processo em questão, cabe a seguinte consideração:

As informações apresentadas atendem aos aspectos fundamentais das Resoluções CNS 196/96, 251/97 e 292/99, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos.

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisas da UNISA, de acordo com as atribuições da Resolução 196/96, manifesta-se pela **APROVAÇÃO** do projeto de pesquisa, visando avaliação da cicatrização do tecido mole bucal em ratos após suspensão da indução ao fumo.

São Paulo, 14 de Dezembro de 2005

PROF. DR. CARLOS DE SOUSA LUCCI
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisas
UNISA - Universidade de Santo Amaro

13/abril/2006
São Paulo - SP

ANEXO B

RP-002	FICHA DE INSCRIÇÃO ANATOMO-PATOLÓGICA	
	Versão 00	Vigência 00/00/00
Elaboração CSR	Verificação LVB	Aprovação LCMZ
03/02/2006	06/02/2006	26/08/2005

☒ matriz☐ filhotecódigo: B. Quad/Ciganoespécie: Rato

conservação:

☐ temp. ambiente☒ refrigeração☐ fixadorsexo: ☒ macho ☐ fêmeadata morte: 4/7/06hora aprox. morte: 17:00hdata necrópsia: 05/07/06hora aprox. necrópsia: 16:00h

Achados anátomo - Patológicos:

- Torax esmagurado.
- Ausência de cabeça
- Músculos torácicos dilacerados.
- Feridas em toda a dorso.

Moléstia principal: DecapitaçãoCausa mortis: Crise neurogênica

Achados histopatológicos:

Não foi possível extrair material devido ao estado de decomposição.

Caroline S. Fuschini
Assinatura da Patologista Auxiliar

05/07/06
data

Caroline S. Fuschini
Assinatura da Patologista Principal

17/07/06
data