LUCIANE HIRAMATSU AZEVEDO

**PROCESSO REPARACIONAL EM TECIDO CUTÂNEO E ORAL DE
RATOS SUBMETIDOS À INCISÃO CIRÚRGICA COM *LASERS* DE
CO₂ E DIODO, E COM BISTURI ELÉTRICO E CONVENCIONAL.
UMA ANÁLISE MORFOMÉTRICA**

São Paulo

2005

Luciane Hiramatsu Azevedo

**Processo reparacional em tecido cutâneo e oral de ratos
submetidos à incisão cirúrgica com *lasers* de CO₂ e
diodo, e com bisturi elétrico e convencional.
Uma análise morfométrica**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Área de Concentração: Diagnóstico Bucal

Orientador: Prof. Dr. Dante Antonio Migliari

São Paulo

2005

FOLHA DE APROVAÇÃO

Azevedo LH. Processo reparacional em tecido cutâneo e oral de ratos submetidos à incisão cirúrgica com *lasers* de CO₂ e diodo, e com bisturi elétrico e convencional. Uma análise morfométrica [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2005.

São Paulo, ____/____/2005

Banca Examinadora

1) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

2) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

3) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

4) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

5) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Ao meu marido **Ivan**, com muito amor, quero estar ao seu lado sempre.

A minha filha **Nicole**, razão do meu viver.

Aos meus pais, **Akiko** e **Gedeão**, pelo eterno amor e exemplo de vida. Devo tudo a vocês.

Ao **Allan**, tenho a felicidade de tê-lo como irmão.

Aos meus sogros, **Rosa** e **Fares**, por todo carinho e o imenso apoio.

Aos meus cunhados, **Samar**, **Alexia**, **Fernando**, **Fares** e **Fernanda**, pessoas adoráveis e companheiras.

A **Deus**, por iluminar meu caminho e me guiar nos momentos difíceis.

AGRADECIMENTOS

Ao orientador Prof. Dr. Dante Antonio Migliari, por todo o ensinamento científico, pelo tempo e paciência dedicados a mim, um grande amigo.

Ao Prof. Dr. Carlos de Paula Eduardo, pelo exemplo de profissionalismo, integridade e dedicação incansável, um expoente da Odontologia.

À Profa. Dra. Suzana Cantanhede Orsini Machado de Sousa, seu respeito à ciência é um exemplo a seguir.

À Profa. Dra. Maria Lúcia Zaidan Dagli, por me receber com carinho e pela imensa ajuda na análise e interpretação estatística.

Ao Prof. Dr. Moacyr D. Novelli, sempre pronto para ajudar com sua criatividade e inteligência ímpar.

À Profa. Dra. Luciana Correa, pela seriedade e ajuda constante na interpretação dos dados.

Ao Prof. Dr. Marco Antonio Gioso, pelo grande esforço para a viabilização desse projeto.

À Profa. Dra. Márcia Martins Marques, um grande estímulo na vida acadêmica.

À Profa. Dra. Denise Maria Zezell e à Profa. Dra. Martha Simões Ribeiro, que me proporcionaram a importante base científica na área do *laser*.

À Profa. Dra. Sheila Gouw-Soares, com admiração e amizade.

À Mariana Lage-Marques, exemplo de dedicação e persistência.

À Vivian Galleta, pela grande ajuda e por sua amizade.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação em Diagnóstico Bucal, pela cumplicidade e companheirismo.

Às secretárias Nina e Cida, o meu agradecimento por todo apoio.

Ao Paulo Wagner da empresa Bioluz, pela confiança dispensada e por acreditar na pesquisa.

Aos amigos do LELO, Aroldo, Ciça, Cida, Cláudia, Daiane, Edgar, Jô, Karin, Liliane, Pati, Pelino, Ricardo e Tannous, pela união e superação dos desafios.

A todos os estagiários do LELO, pelo entusiasmo que revigora meu trabalho.

Aos colegas de trabalho da Clínica SOL, do HU, da FUNDECTO e do Mestrado Profissionalizante, por proporcionarem um agradável convívio e precioso apoio.

Aos funcionários da biblioteca da FOU SP, em especial Vânia e Cida, pela serenidade e otimismo.

À FAPESP, pelo auxílio dado a essa pesquisa (Processo 2004/06794-0).

À ffo - FUNDECTO pela doação do *laser* de CO₂ ao LELO.

Ao LELO e ao LIDO da FOU SP pela infra-estrutura disponibilizada.

À empresa Lasering do Brasil pelo *laser* de diodo doado ao LELO para o desenvolvimento de pesquisas.

Azevedo LH. Processo reparacional em tecido cutâneo e oral de ratos submetidos à incisão cirúrgica com *lasers* de CO₂ e diodo, e com bisturi elétrico e convencional. Uma análise morfométrica [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2005.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar e comparar a reparação tecidual após incisões com os *lasers* de CO₂ e de diodo, bisturi elétrico e convencional em língua e pele de 30 ratos *Wistar*. Incisões de 5 mm de comprimento por 2 mm de profundidade na pele, e de 2,5 mm de comprimento por 1 mm de profundidade na língua, foram feitas nestes tecidos, e os animais sacrificados nos intervalos de zero, 24, 48, 72 horas, 7 e 14 dias após as intervenções. Cortes histológicos foram obtidos das incisões e submetidos a 3 tipos de análises: quantificação do dano tecidual, de mastócitos e da densidade de colágeno tipo I. Os dados foram submetidos à análise estatística pelo teste ANOVA de Kruskal-Wallis e pelo teste de comparações múltiplas de Turkey-Kramer, com nível de significância estabelecida para $P < 0,05$. Os resultados mostraram que o dano tecidual na pele das incisões realizadas com *lasers* e bisturi elétrico foi significativamente maior do que o do bisturi convencional ($P < 0,05$). Quanto às incisões na língua, houve diferença significativa de menor dano tecidual resultante da incisão do bisturi convencional comparado com o das incisões realizadas com *laser* de CO₂ 2 W, *laser* de diodo 4 W e bisturi elétrico ($P < 0,05$). A quantificação de mastócitos mostrou diferenças estatísticas entre as incisões realizadas com bisturi convencional em relação às outras incisões (*lasers* e bisturi elétrico), principalmente nas 48 e 72h, tanto na pele quanto na língua. Quanto à quantificação de colágeno, apenas no 7º dia houve diferença estatisticamente significativa, ocorrendo maior quantidade de colágeno tipo I somente na incisão com

bisturi convencional comparada com a do bisturi elétrico ($P < 0.05$). No 14º dia, os dados morfométricos de colágeno foram semelhantes em todas as técnicas utilizadas. Concluimos que no período final analisado do processo reparacional, os dados morfométricos foram semelhantes em todas as técnicas utilizadas, apesar das diferenças ocorridas quanto ao dano tecidual, quantificação de mastócitos e colágeno tipo I no início do processo. Em princípio, dentro de um mesmo padrão de incisão, todos os instrumentos cirúrgicos geraram um processo reparacional semelhante, variações entre eles podem estar associadas às características do tecido, como foi observado entre a pele e mucosa.

Palavras-Chave: ratos, incisões pele e língua, mastócitos, colágeno tipo I, reparação tecidual

Azevedo LH. Healing process on rat skin and tongue submitted to CO₂ and diode *lasers*, eletrosurgery and scalpel incisions. A morphometric analysis [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2005.

ABSTRACT

The aim of this study was to quantify and compare the healing process after incision with CO₂ (2 W e 4 W) and diode *lasers* (2 W and 4 W), electrosurgery (2 W) and scalpel in the skin and tongue of Wistar rats (30 animals were used). One incision of each technique (6 in total) of 5 mm long and 2 mm deep was made in the dorsal skin and dorsal tongue. The animals were sacrificed at zero, 24, 48, 72 hours, 7 and 14 days after incisions. Histological sections were made from the wound areas and subjected to analyses of area of tissue damage, quantification of mast cells and density of collagen type I. The data were submitted to the ANOVA of Kruskal-Wallis and compared by Turkey-Kramer. The level of significance was set at 5% ($P < 0.05$). The results showed difference concerning area of tissue damage, occurring significant statistically difference between the incisions with scalpel compared with those of other techniques (*lasers* and electrosurgery) in skin ($P < 0.05$). On the tongue, there was statistical difference, with less tissue damage on scalpel incision compared with that of CO₂ (2 W) and diode *lasers* (4 W) and electrosurgery incisions ($P < 0.05$). The quantification of mast in the incisions showed statistical differences between the incisions, especially in 48 and 72h, both on the skin and tongue. Concerning the collagen quantification, statistical difference was found only in 7th day, the collagen types I was only more evident on scalpel incision than with the electrosurgery ($P < 0.05$). In 14th day, the morphometric data were similar in all types of incisions. Based on these results, it is possible to conclude that at the end of the analyzed period, the morphometric data were similar in all techniques, even though

there were differences concerning tissue damage, quantification of masts cell and collagen type I at the beginning of the process. Additionally, the healing process proceeds similarly in all this technique as long as the incisions are made in a similar pattern; variations may occur depending on the type of the tissue, as was shown here between the skin and tongue.

Key-works: rats, incision in skin and tongue, mast cells, collagen type I, tissue repair.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 4.1 - A (pele) e B (língua) – Duas figuras referem-se às incisões superiores realizadas com *laser* de CO₂ (a esquerda 2W e a direita 4W), incisões ao centro realizadas com *laser* de diodo (a esquerda 2W e a direita 4W), incisões inferiores realizadas com bisturi elétrico a esquerda e bisturi convencional a direita34
- Figura 4.2 - A. *Pele*. Imagem captada da incisão realizada com *laser* de CO₂ (2W). B. Quantificação da área de dano térmico em *pixels* - CO₂ (2W). C. Imagem captada da incisão realizada com *laser* de CO₂ (4W). D. Quantificação da área de dano térmico em *pixels* - CO₂ (4W). E. Imagem captada da incisão realizada com *laser* de diodo (2W). F. Quantificação de dano térmico em *pixels* - diodo (2W). Aumento original 100X36
- Figura 4.3 - G. *Pele*. Imagem captada da incisão realizada com *laser* de diodo (4W). H. Quantificação da área de dano térmico em *pixels* - diodo (4W). I. Imagem captada da incisão realizada com bisturi elétrico. J. Quantificação da área de dano térmico em *pixels* - bisturi elétrico. K. Imagem captada da incisão realizada com bisturi convencional. L. Inexistência de área de dano térmico na incisão realizada com bisturi convencional. Aumento original 100X37
- Figura 4.4 - A. *Língua*. Imagem captada da incisão realizada com *laser* de CO₂ (2W). B. Quantificação da área de dano térmico em *pixels* - CO₂ (2W). C. Imagem captada da incisão realizada com *laser* de CO₂ (4W). D. Quantificação da área de dano térmico em *pixels* da incisão - CO₂ (4W). E. Imagem captada da incisão realizada com *laser* de diodo (2W). F. Quantificação de dano térmico em *pixels* - diodo (2W). Aumento original 100X38
- Figura 4.5 - G. *Língua*. Imagem captada da incisão realizada com *laser* de diodo (4W). H. Quantificação da área de dano térmico em *pixels* - diodo (4W). I. Imagem captada da incisão realizada com bisturi elétrico. J. Quantificação da área de dano térmico em *pixels* - bisturi elétrico. K. Imagem captada da incisão realizada com bisturi convencional. L. Inexistência de área de dano térmico na incisão realizada com bisturi convencional. Aumento original 100X39

Figura 4.6 -	Imagem captada para o <i>software</i> ImageLab e contagem de mastócitos presente em um campo em língua de rato. Aumento original 400X	40
Figura 4.7 -	Imagem evidenciando o colágeno tipo I polarizado em vermelho. Aumento original 40X	41
Figura 4.8 -	A - Imagem do colágeno tipo I em vermelho. B - Quantificação do colágeno no programa Image Pro-Plus (Aumento original 40X).....	42
Figura 5.1 -	<i>Pele</i> . Área do dano tecidual quantificada em <i>pixels</i>	43
Figura 5.2 -	<i>Língua</i> . Área do dano tecidual quantificada em <i>pixels</i>	44
Figura 5.3 -	<i>Pele</i> . Número de mastócitos na área de 0,48 mm ² nas incisões realizadas em língua de ratos	46
Figura 5.4 -	<i>Língua</i> . Número de mastócitos na área de 0,24 mm ² nas incisões realizadas em língua de ratos	47
Figura 5.5 -	<i>Pele</i> . Quantificação de colágeno na derme de ratos	48
Figura 5.6 -	<i>Língua</i> . Quantificação de colágeno na língua de ratos	49

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

Er	érbio
Er:YAG	matriz hospedeira YAG dopada com érbio
Et al	el alli, e outros
CO ₂	dióxido de carbono
cm	centímetro(s)
cm ²	centímetro(s) quadrado(s)
Ho	hólmio
Ho:YAG	matriz hospedeira YAG dopada com hólmio
mm	milímetro(s)
mm ²	milímetro(s) quadrado(s)
Nd	neodímio
Nd:YAG	matriz hospedeira YAG dopada com neodímio
nm	nanômetro(s)

px *pixel* – menor unidade de uma imagem na tela do computador ou televisão

YAG Yttrium Aluminum Garnet, granada de ítrio e alumínio

μm^2 micrômetro(s) quadrado(s)

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	graus Celsius
h	hora(s)
s	segundo(s)
W	watt(s) – unidade de potência

SUMÁRIO

	p.
1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	19
2.1 <i>Laser</i>	19
2.2 Mastócitos	26
2.3 Colágeno	28
3 PROPOSIÇÃO	30
4 MATERIAL E MÉTODOS	31
5 RESULTADOS	43
6 DISCUSSÃO	50
7 CONCLUSÕES	59
REFERÊNCIAS	60
ANEXOS.....	68

1 INTRODUÇÃO

As principais razões que nortearam o desenvolvimento desse estudo foram fundamentadas na aplicação do *laser* como método terapêutico avançado no tratamento de lesões da mucosa oral. Por esse motivo, os conceitos iniciais desse trabalho foram direcionados ao *laser* na área odontológica.

Os princípios básicos que proporcionaram o desenvolvimento do *laser* (do inglês *light amplification by stimulated emission of radiation*) foram inicialmente descritos por Albert Einstein, em 1917. A concepção final e o uso experimental do *laser* ocorreu somente em 1960 por Theodor Maimann, um físico inglês, utilizando *laser* de rubi (GUTKNECHT; FRANZEN, 2004). Subseqüentemente, o *laser* alcançou sua aplicação na área médica, particularmente na oftalmologia, dermatologia e cirurgia geral. Ainda nos anos 60, o *laser* foi introduzido na estomatologia para fins cirúrgicos, especificamente no tratamento de lesões angiomasas. Outras especialidades odontológicas, como a dentística operatória, a cirurgia oral, a endodontia e a periodontia, foram mais tardes beneficiadas do laser para fins terapêuticos (LOIACONO et al., 1993; PICK; POWELL, 1993).

Na área da estomatologia, *lasers* de alta potência, principalmente de CO₂ e de diodo, têm sido utilizados para o tratamento cirúrgico de vários tipos de lesões, particularmente neoplasias benignas, processos proliferativos, degenerações linfomangiomatosas, lesões potencialmente cancerizáveis, e casos seletivos de neoplasias malignas (GÁSPÁR, 1994; ROMANOS; NENTIWIG, 1999). Os *lasers* de baixa potência atuam como antiinflamatório, analgésico e biomodulador, e tem igualmente aplicação em determinadas condições patológicas que afetam a mucosa

oral, principalmente a mucosite resultante de quimioterapia e radioterapia. Outras indicações para o *laser* de baixa potência são as ulcerações aftosas recorrentes, herpes labial recorrente, parestesias, entre outras indicações (KHULLAR et al., 1996; MEDRADO et al. 2003; MIGLIORATI et al., 2001; ZIMMERMANN, 1990).

A utilização do *laser* como instrumento eficaz para tratamento de lesões extensas, principalmente as leucoplásicas e angiomatosas, tem produzido benefícios aos pacientes em relação às técnicas convencionais. As vantagens do *laser* de CO₂ em tecidos moles são bastante conhecidas, favorecendo a excisão e controle do sangramento, proporcionando melhor visualização do campo cirúrgico, reduzindo tempo de procedimento e bacteremia (PICK; PECARO, 1987; FRAME, 1985). As desvantagens do uso do *laser* de CO₂ nos tecidos resultam principalmente de seus efeitos térmicos, aumentando a área do dano tecidual (KARDOS; HOLT; FEGURSON, 1989; WILDER-SMITH et al., 1995). Alguns autores argumentam que o *laser* aumenta o tempo de cicatrização nas feridas cirúrgicas, e o que os sinais de inflamação são mais proeminentes (LUOMANEN, 1987). Sobre este aspecto, estudos histológicos em cães, submetidos à incisão com *laser* CO₂ e bisturi convencional na mucosa jugal, utilizando técnica de imunohistoquímica, mostraram redução de miofibroblastos e colágeno em todas as fases de reparação com *laser* CO₂ em comparação com a do bisturi convencional (FISHER et al., 1983). Resultados semelhantes a estes foram verificados por Adrian (1988) em língua de ratos, e também por Luomanen (1987) em mucosa jugal de ratos. Outro aspecto avaliado foi a preservação da propriedade elástica da mucosa oral de cães com a técnica de vaporização da lesão com o *laser* de CO₂ comparada com a excisão cirúrgica convencional (ROODENBURG; BOSCH; BORSBOOM, 1990). Algumas investigações clínicas têm mostrado que a reparação da mucosa oral e

outras partes do corpo tratadas com *laser* de CO₂ ocorre com menor grau de cicatriz e contração do tecido quando comparada com a reparação resultante de métodos cirúrgicos convencionais (FISHER et al., 1983; FRAME, 1985; STEIN, 1984). Todavia, não há estudos em humanos (provavelmente por razões éticas) comparando a reparação tecidual entre cirurgia a *lasers* e técnicas convencionais, utilizando métodos de análises morfológicas e morfométricas.

Embora temos atuado com muita freqüência em cirurgias nos ambulatórios de nossa instituição no tratamento de lesões orais, ora utilizando técnica convencional, ora *lasers*, ou ainda, bisturi elétrico, não dispomos de informações cientificamente fundamentadas sobre qual método cirúrgico é o mais adequado e qual apresenta melhor conforto pós-operatório ao paciente. Dados preliminares de nossas observações clínicas indicam que o processo reparacional da mucosa oral, pós-cirurgia com *laser* de CO₂ ou diodo, é geralmente mais demorado em relação ao da reparação tecidual de cirurgias semelhantes removidas por técnica convencional (bisturi).

Lasers para fins cirúrgicos encontram-se ainda em crescente processo de investigação, que inclui a necessidade de se estudar histologicamente fatores de reparação tecidual, avançando no conhecimento de melhores parâmetros do *laser*, em termos de especificidades técnicas que visam proporcionar menor agressão tecidual.

O presente estudo objetiva estabelecer alguns parâmetros comparativos de reparação entre *lasers* CO₂ e diodo e técnicas convencionais, observando os diferentes estágios da reparação tecidual através da microscopia de luz quantificados por morfometria da área de dano tecidual, identificados por histoquímica para quantificação de mastócitos e para quantificação de colágeno.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Laser*

O *laser* de alta potência utilizado em cirurgias de tecidos moles ganhou credibilidade, devido às suas vantagens de hemostasia redução da necessidade de sutura, redução bacteriana, pós-operatório com menor pronunciamento dos sinais de inflamação (AZAZ et al., 1996; LUOMANEN, 1992; PICK; PECARO; SILBERMAN, 1985; ROMANOS et al., 2004; ROODENBURG; BOSCH; BORSBOOM et al., 1990). Contudo, é de extrema importância os parâmetros e o tipo de *laser* que será utilizado, no intuito de se evitar danos térmicos exagerados e conseqüentemente levando a um retardo acentuado no processo de reparação tecidual.

Maiman (1960) apresentou o primeiro *laser* desenvolvido, utilizando cristais de rubi para a produção de luz vermelha, de comprimento de onda de 0,69 nm. No entanto, os tecidos biológicos não absorviam o feixe, devido às propriedades inerentes a este *laser*.

Quatro anos mais tarde, Patel (1964) desenvolveu o *laser* de CO₂, de comprimento de onda de 10,6 µm, com sua primeira irradiação bem sucedida em tecidos moles no Laboratório de Polanyi, em 1966 (GÁSPÁR, 1994; POLANYI; BREDEMEIER; DAVIS, 1970). A constatação das propriedades de corte e hemostáticas do *laser* contínuo de CO₂ foram documentadas primeiramente por Yahr e Strully (1966).

Na década de 70, os *lasers* começaram a ser utilizados sucessivamente no tratamento de lesões da cavidade oral. A primeira excisão de um hemangioma, localizado na cavidade bucal, de um garoto de oito anos de idade, foi primeiro caso documentado na literatura cirúrgica oral e maxilofacial americana (SHAFIR; SLUTZKI; BORNSTEIN et al., 1977).

Inúmeros trabalhos, baseados em exames experimentais e clínicos, confirmam a utilidade do *laser* de CO₂ no tratamento cirúrgico de tumores, tanto benignos (hemangiomas, linfangiomas, etc) como malignos (carcinomas, sarcomas), em cavidade oral e na face (GÁSPÁR, 1994; MOSKALIK et al., 2005).

Em 1989, surgiu a primeira referência ao emprego do *laser* de Nd:YAG pulsado (MYERS; MYERS; STONE et al., 1989). Ele é citado favoravelmente no tratamento de tecidos moles; sendo o espectro de suas indicações menor que o do *laser* de CO₂, mas apresenta vantagens comparáveis sobre os métodos convencionais (MYERS et al., 1992; ROMANOS; PELEKANOS; STRUB, 1995). Há uma importante revisão dos usos do *laser* de neodímio na cirurgia oral e maxilofacial, descrevendo as suas aplicações para coagulação de lesões angiomatosas, hemostasias, cirurgias artroscópicas da ATM e em combinação com o *laser* de CO₂ nas ressecções de tecidos vasculares e palição de neoplasias em estágio mais avançado (BRADLEY, 1997).

Existem estudos em tecidos moles com *laser* de argônio (SVENSSON et al., 1992), *laser* de Ho:YAG (HENDLER et al., 1992; NUEBLER-MORITZ et al., 1997), com *laser* de Er:YAG que apresenta indicações em cirurgias que não necessitam de intensa hemostasia (NUEBLER-MORITZ et al., 1997). Na década de 90, surgiram os primeiros trabalhos com *laser* de diodo de alta potência em tecidos moles. A penetração de seus feixes é menor que a do *laser* contínuo de Nd:YAG, embora

superior à penetração dos feixes do *laser* de CO₂. Seu comprimento de onda é recomendado na ressecção de tecidos moles e nas cirurgias periimplantar e pré-protética (RIZZO et al., 2004; ROMANOS; NENTIWIG, 1999).

Através dessa literatura, pôde-se notar que quase todos os tipos de *laser* são absorvidos pelos tecidos moles da cavidade oral. Isso é devido ao seu alto teor de água (infravermelho médio para distante) e à intensa vascularização (ultravioleta a infravermelho próximo) presente nesses tecidos (GUTKNECHT; FRANZEN, 2004).

Muitos autores têm realizado investigações comparando efeitos térmicos dos *lasers* versus bisturi convencional ou *lasers* versus bisturi elétrico. Obviamente, bisturi convencional não causa necrose por dano térmico, porém falha em promover a hemostasia, redução bacteriana, além de outras vantagens já citadas anteriormente. Alguns autores reportam que o dano térmico é 3 a 5 vezes mais profundo após o uso do bisturi elétrico do que o uso do *laser* de CO₂ (GÁSPÁR et al., 1992; HUKKI et al., 1989; PALMER; MCGILL, 1992; TURNER et al., 1992). Estudos têm sido publicados em relação aos efeitos do *laser* nos tecidos moles com diferentes comprimentos de onda e parâmetros. Os *lasers* de CO₂ (10,6µm) geralmente produzem zonas de dano térmico mais estreitas do que o *laser* de Nd:YAG, devido a maior absorção da luz de CO₂ por tecidos moles (LUCIANO; FRISHMAN; MAIER, 1992; NELSON; BERNIS, 1988).

A cicatrização de incisões cirúrgicas realizadas com *lasers* de alta potência difere da convencional, pois há a formação de uma camada carbonizada na superfície da ferida, a qual atua como uma cobertura de proteção. Após 24 horas, começa a ser formado um coágulo fibrinoso superficial. O epitélio de regeneração cobre o coágulo fibrinoso nas margens da ferida, ocorrendo, portanto, a cicatrização por segunda intenção. O epitélio se prolifera entre o coágulo superficial e o tecido de

granulação subjacente. Além disso, os sinais de reação inflamatória são menores, a quantidade de miofibroblastos é menor, há menor contração da ferida, menos quantidade de colágeno é formado, e a regeneração epitelial é atrasada e menos regular (FISHER; FRAME, 1984).

A presença de cicatriz e a contração de feridas no tecido conjuntivo são desfavoráveis esteticamente e podem limitar a função da região afetada. Estes fenômenos são causados pela organização do tecido de granulação e da contração dos miofibroblastos. Os miofibroblastos são derivados de fibroblastos e células mesenquimais menos diferenciadas, e possuem uma rede de microfilamentos arranjados paralelamente ao longo de seu eixo axial. Os microfilamentos por sua vez, são compostos por actina ou proteínas associadas a esta, e são importantes na geração de força motriz e locomoção celular (LUOMANEN; LEHTO; MEURMAN, 1988).

Clinicamente é observado que a reparação de tecidos tratados com *laser* de CO₂ ocorre com menor contração e cicatriz do que as provocadas com bisturi convencional. Isto está relacionado com a menor quantidade de miofibroblastos em feridas de *laser*, e pela falta de organização entre estas células (LUOMANEN; LEHTO; MEURMAN, 1988; ZEINOUN et al., 2001).

É importante salientar que o uso de densidades de energias maiores pode levar ao acúmulo de calor e dano térmico às estruturas adjacentes. Maiores parâmetros de energia e tempo implicam em maior temperatura e danos térmicos, e assim o tempo para a reparação também se entende. O diâmetro do feixe também determina variação na densidade de potência: quanto maior o diâmetro, maior a densidade. Portanto, a quantidade de destruição tecidual e a profundidade de penetração do feixe *laser* variam de acordo com o tamanho do feixe, densidade de

potência e/ou energia, e a duração da exposição do tecido ao *laser* (PINHEIRO et al., 2002; WILDER-SMITH et al., 1995). A introdução do *laser* na área de saúde resultou nas diversas aplicações com grande benefício à população em vários tipos de lesões. Diversos estudos experimentais têm sido feitos no sentido de elucidar seus efeitos nos tecidos moles, variando-se os parâmetros e comparado diferentes técnicas como bisturi convencional e elétrico.

É interessante observar que a cauterização promovida pelo eletrocautério não promove a diminuição da bacteremia como o *laser* de CO₂. Isto é devido a maior inflamação local produzida pela eletrocirurgia, havendo aumento da permeabilidade vascular e, portanto, ocorrendo maior chance de bacteremia (KAMINER et al. 1990). Este efeito inflamatório exacerbado no manejo do eletrocautério é conseqüência de danos térmicos propagados para os tecidos adjacentes. O aumento da temperatura dos tecidos irradiados também pode variar de acordo com o uso do *laser*, apesar desta variação estar distribuída mais superficialmente nos tecidos. Outro aspecto estudado foi a existência de um tecido de granulação em semanas posteriores, mais significativo na eletrocirurgia com voltagem constante, comparado com o *laser* de CO₂ no tecido mucoso de porco, sugerindo que a reparação poderia estar atrasada com o bisturi elétrico (LIBOON; FUNKHOUSER; TERRIS, 1997).

Estudos recentes com os *lasers* de diodo têm sido realizados e vêm demonstrando eficiência em cirurgias de tecidos moles como remoção de tumores de tecidos moles, frenectomias, excisão de hiperplasias gengivais, vestibuloplastias, remoção de hemangiomas e em remoção de tecido mole de periimplantite. O *laser* de diodo promove hemostasia suficiente durante o trans-operatório e incisão precisa, com vantagens no pós-operatório (ROMANOS; NENTWIG, 1999; ROMANOS et al., 2004).

Os *lasers* de alta potência em tecidos moles podem ser utilizados de duas maneiras: excisão de tecidos moles, tanto tumores quanto partes da mucosa, de uma maneira similar ao bisturi elétrico ou à lâmina convencional, ou vaporização da superfície mucosa em lesões extensas (ROSSMAN et al., 1994). Há estudos utilizando os *lasers* para remoção de lesões extensas, algumas potencialmente cancerizáveis, entretanto, deve-se ressaltar a necessidade de um acompanhamento de vários anos para determinar a taxa de recorrência e a estabilidade do novo epitélio após o tratamento o *laser*, assim como para obter comparações com a cirurgia convencional (FISHER; FRAME, 1984; GÁSPÁR, 1994; ROSSMANN et al., 1994).

Cada tipo de *laser* possui características biológicas próprias, que se relacionam com o comprimento de onda ou com a cor de cada tipo de *laser*, dependendo do meio ativo em que for produzido. Conseqüentemente, a profundidade de penetração de cada tipo de *laser* nos órgãos varia de acordo com a capacidade de absorção da energia *laser* pela água, assim como em relação à cor dos tecidos.

A evaporação dos tecidos durante o ato cirúrgico irá depender dos diferentes tipos de *laser*. O tecido biológico pode responder à ação do *laser* através de reflexão, transmissão, difusão e absorção. Para que haja efeito da luz *laser* sobre o tecido, é necessário que este o absorva e converta a radiação em calor. O aquecimento pode resultar nos seguintes efeitos nos tecidos: coagulação, carbonização ou vaporização. A coagulação pode produzir tanto uma hemostasia ou necrose de pequenos vasos sanguíneos com diâmetros de 0,3 a 0,5 mm, como a laqueadura de vasos linfáticos. A vaporização pode ser usada para o corte cirúrgico ou a evaporação tecidual, removendo a superfície do tecido normal ou patológico (MELO; MELO, 2001).

2.1.1 *Laser* de CO₂

O *laser* de CO₂ possui meio ativo no estado gasoso. Para sua emissão utiliza uma descarga elétrica que excita uma mistura de gases contidos dentro de um tubo de quartzo (80% hélio, 15% nitrogênio e 5% dióxido de carbono).

Este tipo de *laser* está incluído dentro do campo de radiação eletromagnética não visível, ou seja, infravermelho, podendo emitir em alguns comprimentos de onda, 9,6, 9,3 e 10,6 μm . O *laser* de CO₂ emitindo em 10,6 μm não pode ser transmitido por fibra óptica, pois este é absorvido pela mesma, e sim por braço articulado metálico oco, que apresenta em seu interior um jogo de espelhos refletores. Esse *laser* é facilmente absorvido por tecidos com grande conteúdo de água, independente de sua coloração, apresentando uma penetração bastante superficial (ROMANO, 2003).

2.1.2 *Laser* de diodo

O *laser* de semicondutores ou *laser* de diodo atualmente é o mais eficiente, pois consegue atingir marcas de 40% de eficiência elétrica. Os *lasers* de uma maneira geral, necessitam de um gasto energético muito alto para transformarem sua fonte de alimentação, que é geralmente elétrica. Alguns *lasers* chegam a ter no máximo 3% do rendimento da energia elétrica transformada em energia óptica de *laser*. Esse *laser* é um pequeno cubo de material semicondutor de dimensões sub-milimétricas, que converte diretamente a corrente elétrica em energia luminosa. O

material que compõe o diodo cresce em camadas, de baixo para cima, mediante técnicas extremamente sofisticadas. A energia luminosa é emitida em forma de feixe *laser* por uma das faces do cubo e apresenta no máximo uma potência de poucos Watts (QUINTO JR, 2001).

2.2 Mastócitos

A reparação dos tecidos moles passa por uma complexa série de eventos inter-relacionados que envolvem atividades tanto físicas como químicas. Estes processos necessitam de extensa investigação e esforços têm sido feitos no sentido de acelerar o processo de reparação tecidual (WONG; HOLLINGER; PINERO, 1996). Há um aumento no número de células, incluindo queratinócitos, fibroblastos, neutrófilos, macrófagos, linfócitos e mastócitos no processo reparacional, que agem com células imunológicas e regulam a liberação das diversas citocinas (ARTUC et al., 1999). Através das diversas observações histológicas, assume-se que os mastócitos são células importantes nesse processo de reparação e são conhecidas por participarem de três fases: reação inflamatória, angiogênese e reabsorção da matriz extracelular. A reação inflamatória é mediada por liberação de histamina e ácido aracdônico (IBA et al.; 2004; HIROMATSU; TODA, 2003; TRABUCCHI et al., 1988). Os mastócitos estão envolvidos em ampla atividade fisiológica, devido à inflamação, eles são conhecidos pela liberação de aminas vasoativas, causando aumento da permeabilidade vascular e conseqüentemente edema. Estudos visando a quantificação de mastócitos são importantes, devido ao seu papel no processo de reparação tecidual (ARTUC et al., 1999; BEER et al., 1998; PERSINGER et al.,

1983; SOHN, 1982). No entanto, o papel dos mastócitos no processo de reparação tecidual não está totalmente desvendado. Muitos estudos têm se limitado ao papel dos mastócitos na fase aguda inflamatória, porém, poucos são conhecidos sobre sua função na fase tardia, em que a remodelação do tecido é iniciada. Apesar da suspeita de participarem da remodelação do tecido durante a fase de reparação tecidual, o mecanismo molecular de sua ação ainda não está claro. Dos componentes existentes nos grânulos dos mastócitos, a quimase parece ser relevante na remodelação dos tecidos. A participação dessa substância tem importância no processo reparacional, devido às evidências obtidas através de estudo *in vitro*, demonstrando que quimases de humanos e roedores ativam a procollagenase, degradam matriz extracelular, liberam TGF- β 1, que é uma potente citocina profibrótica, e processam procolágeno para formação de fibrilas colágenas (NISHIKORI et al., 1998).

O aumento do número de mastócitos, o grande acúmulo e liberação de aminas vasoativas, paralelamente ao aumento de colágeno na região lesada, reduz a área da ferida (LIPSHITS; ZVIAHINTSEVA, 1997). A maioria das cicatrizes produzem uma quantidade apropriada de tecido conjuntivo para completar o defeito dérmico, porém, em certas ocasiões, o tecido fibroso excessivo pode ser depositado, levando à formação de cicatriz hipertrófica ou quelóide (ASBOE-HANSEN, 1960; KISHER; BAILEY, 1972; PLACIK; LEWIS, 1992). Esses tipos de cicatrizes patológicas podem muitas vezes ser associadas e predispostas a diversos fatores, mas os eventos celulares envolvidos nessa formação não estão totalmente estabelecidos.

2.3 Colágeno

A pele recobre a superfície do corpo e apresenta-se constituída por uma porção epitelial (epiderme) e uma porção conjuntiva (derme). A epiderme tem por função fornecer proteção às demais camadas do corpo, enquanto a derme caracteriza-se por ser uma camada mais interna, dando sustentação a epiderme.

A pele é constituída por várias camadas, sendo a mais periférica, de fácil regeneração e menor vascularização, em relação a tecidos internos do organismo. A pele sofre um processo de regeneração constante com células localizadas em sua camada basal, mais profunda, migrando deste para o estrato mais superficial, onde sofrem alterações morfológicas, tornando-se queratinizadas. A seguir, ocorre um processo de descamação, que dá lugar à contínua reposição de células mortas por células novas, facilitando o processo de regeneração da epiderme (ROSS; ROWELL, 1989).

As fibras colágenas correspondem à aproximadamente 75% do peso da pele. O colágeno tipo I compõe parte considerável das fibras extracelulares, que são, basicamente, responsáveis pela força de tensão da pele. Calcula-se que o colágeno tipo I corresponda a aproximadamente 80% de todo o colágeno da pele de um adulto humano (UITTO; PULKKINEN; CHU, 1999). Outro tipo de colágeno é o tipo II, que é geneticamente diferente do tipo I e representa aproximadamente 10% de todo o colágeno presente na pele de um adulto humano (EPSTEIN JR, 1974). Os diversos tipos de colágeno são produzidos por células chamadas fibroblastos. Muitos fatores influenciam essa produção, bem como a maior ou menor proliferação destas células, o que pode ser determinante na formação de cicatrizes patológicas, como quelóides (KAMAMOTO et al., 2003).

Os processos biológicos da reparação tecidual podem ser divididos em 4 fases: hemostase, inflamação, proliferação e remodelamento. Embora esses processos sejam descritos como fases distintas, significantes superposições ocorrem. Durante a fase proliferativa da reparação ocorre a migração e proliferação de diversos tipos de células. A fase de remodelação é muito importante para a cirurgia plástica, que determina a aparência final das cicatrizes. Sua aparência depende principalmente de dois fatores: reorientação das fibras colágenas e contração do tecido de granulação (SCHILLING, 1976).

Foi estabelecido que a propriedade de degradação de fibras colágenas é um dos pré-requisitos para o funcionamento de uma pele normal. O acúmulo impróprio das fibras colágenas velhas restringem a remodelação e adaptação da pele. Os colágenos tipo I e III são degradados por várias proteinases extracelulares, sendo a collagenase, sintetizada por fibroblastos presentes na pele ou mucosa, a mais importante (OISHI et al., 2002).

3 PROPOSIÇÃO

Estudo comparativo do processo de reparação tecidual na pele e língua de ratos, após incisões com os *lasers* de CO₂ ou diodo, bisturi elétrico e bisturi convencional, utilizando métodos morfométricos de extensão do dano tecidual, quantificação de mastócitos e colágeno.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Animais

Foram utilizados 30 ratos machos, adultos (*Rattus norvegicus albinus*, variedade Wistar), com peso corporal médio de 150g e idade média de 100 dias, provenientes do Biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, São Paulo. Os animais foram mantidos em gaiolas com maravalha de *pinus* e com acesso a água e ração *ad libitum* e com condições controladas de iluminação (12 horas de luz/12 horas de escuro), temperatura ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$) e umidade ($55\pm 10\%$). A água fornecida foi esterilizada por autoclave; a maravalha e a ração foram esterilizadas por radiação γ . Esse trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, FOUSP (Anexo A).

4.1.2 Instrumentos utilizados

Laser de CO₂, marca comercial Union Medical Engineering Co. UM-L30 (Seul, Coréia do Sul), comprimento de onda de 10600 nm.

Power meter (Coherent Radiation – Palo Alto, EUA), **Reader** (modelo 201, série 2134), **Sensor** (modelo 101).

Laser diodo, arseneto de gálio-alumínio, marca comercial Diodo Lasering L808 (Milão, Itália), comprimento de onda de 808 nm

Power meter (Molelectron detector incorporated, modelo PM 600, Portland, EUA)

Bisturi elétrico, marca comercial Microem - MOD Bi800 (Porto Alegre, RS)

Lâminas de bisturi convencional n°15 (Wiltex®, São Paulo)

Papel carbono, marca comercial Detecto®, Niterói, RJ, para fotoativação da fibra óptica do laser de diodo.

4.2 Método

4.2.1 Método experimental

Os animais foram aleatoriamente distribuídos em 6 grupos experimentais, cada grupo contendo 5 animais. Todo processo experimental foi desenvolvido em um único dia. Os ratos foram anestesiados individualmente com indução anestésica por via parenteral na região abdominal, realizada com Ketamina (25 mg/kg, Holiday®) e Xylazina (10 mg/Kg, Rompun®, Bayer). As incisões foram precedidas por tricotomia (pele) e antissepsia com clorexidina 2% (Riohex®, São José do Rio Preto, SP). Cada animal foi submetido a 12 incisões, 6 na pele (região dorsal) e 6 na língua. As incisões foram manuais, com medidas aproximadas de 5 mm de comprimento por 2 mm de profundidade (**na pele**) e de 2,5 mm de comprimento por

1mm de profundidade **(na língua)**. As medidas das incisões foram monitoradas com auxílio de régua milimetrada (extensão) e de sonda periodontal milimetrada (profundidade). As 6 incisões na pele consistiram de 2 incisões com *laser* de CO₂, uma com potência de 2 W (tempo de aplicação de 8s) e outra de 4 W (tempo de aplicação de 4s), modo contínuo e focado com diâmetro de 0,3mm, sem contato com o tecido e velocidade aproximada de 2,5 mm/s; 2 incisões com o *laser* de diodo, uma com potência de 2 W (tempo de aplicação de 8s) e outra de 4 W (tempo de aplicação de 4s), modo contínuo, aplicado com fibra óptica de 300 µm (0,3 mm) em contato com o tecido e velocidade aproximada das incisões de 2,5 mm/s; uma incisão com bisturi elétrico com 2 W de potência, modo corte, tempo de aplicação de 8s, velocidade aproximada de 2,5 mm/s; e 1 incisão com lâmina de bisturi convencional (profundidade da incisão guiada por uma marca na própria lâmina). Características das incisões são mostradas na Figura 4.1.

As 6 incisões na língua consistiram de: 2 incisões com *laser* de CO₂, uma com potência de 2 W (tempo de aplicação de 4s), e outra de 4 W (tempo de aplicação de 2s), modo contínuo e focado com diâmetro de 0,3mm sem contato com o tecido, velocidade aproximada das incisões de 2,5 mm/s; 2 incisões com o *laser* de diodo, uma com potência de 2 W (tempo de aplicação de 4s) e outra de 4 W (tempo de aplicação de 2s), modo contínuo, aplicado com fibra óptica de 300 µm (0,3 mm) em contato com o tecido e velocidade aproximada das incisões de 2,5 mm/s; 1 incisão com bisturi elétrico com 2 W de potência, modo corte, tempo de aplicação de 4s, velocidade aproximada de 2,5 mm/s; e 1 incisão com lâmina de bisturi convencional (profundidade guiada por uma marca na própria lâmina). Características das incisões são mostradas na Figura 4.2.

Figura 4.1 - A (pele) e B (língua) – Duas figuras referem-se às incisões superiores realizadas com *laser* de CO₂ (a esquerda 2W e a direita 4W), incisões ao centro realizadas com *laser* de diodo (a esquerda 2W e a direita 4W), incisões inferiores realizadas com bisturi elétrico a esquerda e bisturi convencional a direita

Após as intervenções, os animais foram mantidos em gaiolas individuais e posteriormente sacrificados em câmara de CO₂, de acordo com os seguintes intervalos de tempo: animais do Grupo 1, imediatamente após as intervenções; Grupo 2, após 24 horas; Grupo 3, após 48 horas, Grupo 4, após 72 horas, Grupo 5, após 7 dias, Grupo 6, após 14 dias. Após o sacrifício, seguindo os tempos indicados, as áreas incisadas foram cirurgicamente removidas e fixadas em formalina a 10%, e, em seguida enviada ao laboratório, onde as amostras foram processadas, desidratadas e incluídas em blocos parafina.

4.3 Análise morfométrica do dano tecidual resultante dos diferentes procedimentos cirúrgicos

Para análise morfométrica do dano tecidual, cortes de 5 μm das amostras de tecido correspondentes as áreas das incisões realizadas foram coradas com hematoxilina e eosina (H.E.). As áreas adjacentes as incisões foram captadas e digitalizadas através de um sistema de digitalização composto por microscópio de luz convencional Laboval 4 (Carl Zeiss, Alemanha) com câmera tipo CCD (Sony, Japão) conectada a placa digitalizadora Captivator® e acoplada ao computador HP Pentium III com software digital ImageLab 2000 (São Paulo). Este software dispõe de um sistema que permite delimitar o total da área da necrose e quantificá-la em *pixels*. Apenas um único campo foi selecionado cuja área correspondeu a 0,67 mm^2 padronizada para todas as incisões. As figuras ilustram esse método de análise (Figura 4.2 A, B, C, D, E, F, Figura 4.3 G, H, I, J, K, L – pele; Figura 4.4 A, B, C, D, E, F, Figura 4.5 G, H, I, J, K, L – língua).

Figura 4.2 - *Pele*. A. Imagem captada da incisão realizada com *laser* de CO₂ (2W). B. Quantificação da área de dano térmico em *pixels* - CO₂ (2W). C. Imagem captada da incisão realizada com *laser* de CO₂ (4W). D. Quantificação da área de dano térmico em *pixels* da incisão - CO₂ (4W). E. Imagem captada da incisão realizada com *laser* de diodo (2W). F. Quantificação de dano térmico em *pixels* da incisão - (2W). Aumento original 100X

Figura 4.3 - *Pele*. G. Imagem captada da incisão realizada com *laser* de diodo (4W). H. Quantificação da área de dano térmico em *pixels* - diodo (4W). I. Imagem captada da incisão realizada com bisturi elétrico. J. Quantificação da área de dano térmico em *pixels* - bisturi elétrico. K. Imagem captada da incisão realizada com bisturi convencional. L. Inexistência de área de dano térmico na incisão realizada com bisturi convencional. Aumento original 100X

Figura 4.4 - Língua. A. Imagem captada da incisão realizada com *laser* de CO₂ (2W). B. Quantificação da área de dano térmico em *pixels* CO₂ (2W). C. Imagem captada da incisão realizada com *laser* de CO₂ (4W). D. Quantificação da área de dano térmico em *pixels* da incisão - CO₂ (4W). E. Imagem captada da incisão realizada com *laser* de diodo (2W). F. Quantificação de dano térmico em *pixels* da incisão - diodo (2W). Aumento original 100X

Figura 4.5 - Língua. G. Imagem captada da incisão realizada com *laser* de diodo (4W). H. Quantificação da área de dano térmico em *pixels* - diodo (4W). I. Imagem captada da incisão realizada com bisturi elétrico. J. Quantificação da área de dano térmico em *pixels* - bisturi elétrico. K. Imagem captada da incisão realizada com bisturi convencional. L. Inexistência de área de dano térmico na incisão realizada com bisturi convencional. Aumento original 100X

4.4 Contagem de mastócitos nas fases da reparação tecidual

Para análise quantitativa (contagem) de mastócitos, cortes histológicos de 5 μm das amostras de tecido das áreas incisadas foram corados com azul de toluidina. O processo da captação e digitalização de imagens das áreas coradas foi realizado seguindo o mesmo sistema descrito anteriormente. As imagens captadas corresponderam ao tecido contíguo à área de necrose. Para pele foram utilizados 20 campos de superfície (área de cada campo = $0,024 \text{ mm}^2$, totalizando $0,48 \text{ mm}^2$). Para língua foram utilizados 10 campos de superfície (área de cada campo = $0,024 \text{ mm}^2$, totalizando $0,24 \text{ mm}^2$). A contagem de mastócitos foi realizada pelo *software* ImageLab 2000, utilizando barra de ferramenta para contagem (Fig. 4.6).

Figura 4.6 - Imagem captada para o *software* ImageLab e contagem de mastócitos presente em um campo em língua de rato (aumento original 400X)

4.5 Quantificação de colágeno nas fases de reparação tecidual

Para a identificação do colágeno utilizou-se o método histoquímico de picrossírius, que cora colágeno tipo I e III, e permite sua polarização. O colágeno tipo I normalmente cora-se de amarelo, laranja ou vermelho enquanto que o colágeno tipo III cora-se de verde. Para a análise morfométrica da área de colágeno, imagens padronizadas de 1 campo de cada corte histológico ($0,302 \text{ mm}^2$), contendo o colágeno polarizado, foram captadas e digitalizadas por sistema *software* para análise de imagens (image Pro-Plus, Media Cybernetics, Maryland, EUA) no formato *tag image file format* (TIFF). As áreas coradas são identificadas e quantificadas automaticamente, cujo resultado é expresso em μm^2 (Figuras 4.7 e 4.8).

Figura 4.7 - Imagem evidenciando o colágeno tipo I polarizado em vermelho. Aumento original 40X

Figura 4.8 - A - Imagem do colágeno tipo I em vermelho. B – Quantificação do colágeno no programa Image Pro-Plus. Aumento original 40X

4.5 Análise estatística

Os dados foram submetidos a análise estatística pelo teste ANOVA de Kruskal-Wallis e pelo teste de comparações múltiplas de Turkey-Kramer, com nível de significância estabelecida para $P = 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Morfometria do dano tecidual

5.1.1 Pele

A análise morfométrica dos danos teciduais na derme entre *laser* de CO₂ com potências de 2 W e 4 W; *laser* de diodo com potências de 2 W e 4 W, entre os tipos *lasers* e dos *lasers* com bisturi elétrico mostrou que não houve diferença estatisticamente significativa ($P > 0,05$). Porém, foi significativa a diferença estatística da morfometria de dano tecidual entre cada uma dessas técnicas com a do bisturi convencional ($P < 0,0001$). Esses dados são mostrados na Figura 5.1.

Figura 5.1 - *Pele*. Área do dano tecidual quantificada em *pixels*

5.1.2 Língua

A análise morfométrica dos danos teciduais na língua entre *laser* de CO₂ 2 W e 4 W; *laser* de diodo 2 W e 4 W, entre os tipos *lasers* e dos *lasers* com bisturi elétrico não apresentou diferença estatisticamente significativa ($P > 0,05$). Também não houve diferença estatisticamente significativa entre o *laser* de CO₂ 4 W e bisturi convencional, bem como, entre o *laser* de diodo 2 W e bisturi convencional. Os resultados da análise dos danos teciduais na língua foram considerados estatisticamente significantes entre *laser* de CO₂ 2 W e bisturi convencional ($P < 0,01$), entre diodo 4W e bisturi convencional ($P < 0,05$), e entre bisturi elétrico e convencional ($P < 0,05$). Os dados dessa análise são mostrados na Figura 5.2.

Figura 5.2 - Língua. Área do dano tecidual quantificada em *pixels*

5.2 Contagem de mastócitos nas fases da reparação tecidual

5.2.1 Pele

A análise comparativa do número de mastócitos nos processos reparacionais das técnicas cirúrgicas, quantificados imediatamente após as incisões (tempo zero) e no intervalo de 24h, revelou que não houve diferença estatisticamente significativa entre todas as técnicas. Após 48h, o número de mastócitos observados na incisão com bisturi convencional foi significativamente maior em relação às outras incisões (*lasers* de CO₂, de diodo e bisturi elétrico; $P < 0,001$), mas não houve diferença estatisticamente significativa entre os *lasers*, como também, dos *lasers* com bisturi elétrico ($P > 0,05$). Após 72h, a contagem de mastócitos manteve-se significativamente aumentada nas incisões realizadas com bisturi convencional em relação aos *lasers* ($P < 0,001$) e em relação ao bisturi elétrico, mas com menor significância estatística ($P < 0,05$); e entre CO₂ 4W e bisturi elétrico também alcançou significância estatística com maior número de mastócitos com bisturi elétrico ($P < 0,05$). Após 7 e 14 dias, o número de mastócitos não apresentou diferença estatística no processo reparacional comparando todas as técnicas entre si. Esses dados estão representados na Figura 5.3.

Figura 5.3 - *Pele*. Número de mastócitos na área de 0,48 mm² nas incisões realizadas em língua de ratos

5.2.2 Língua

A análise comparativa do número de mastócitos entre os processos reparacionais, quantificados imediatamente após as incisões (tempo zero) e no intervalo de 24h, mostrou que não houve diferença estatisticamente significativa entre todas as técnicas de incisões ($P > 0,05$). Após 48h, a diferença estatística do número de mastócitos nas incisões realizadas com bisturi convencional foi significativamente maior do que o verificado nas incisões de CO₂ 2 W ($P < 0,05$), de diodo 2 W ($P < 0,001$) e 4 W ($P < 0,01$). Após 72h, a contagem de mastócitos manteve-se significativamente aumentada no bisturi convencional em relação ao CO₂ 4 W, ao diodo 4 W e ao bisturi elétrico ($P < 0,05$) e em relação ao diodo 2 W, o nível de significância obtido foi maior ($P < 0,01$). Após 7 dias, o número de mastócitos quantificados não apresentou diferença estatística significativa no processo reparacional comparando todas as técnicas ($P > 0,05$). Após 14 dias,

contagem significativamente maior de mastócitos foi observada na reparação das incisões do bisturi convencional em relação aos *lasers* de CO₂ 2 W e 4 W ($P < 0,01$); das incisões do *laser* de diodo 2 W em relação ao *laser* de CO₂ 2 W e 4 W ($P < 0,05$); do bisturi elétrico em relação aos *lasers* de CO₂ 2 W e 4 W ($P < 0,001$), de diodo 2 W ($P < 0,05$) e de diodo 4 W ($P < 0,01$). Estes dados estão evidenciados na Figura 5.4.

Figura 5.4 - *Língua*. Número de mastócitos na área de 0,24 mm² nas incisões realizadas em língua de ratos

5.3 Quantificação de colágeno nas fases de reparação tecidual

5.3.1 Pele

Somente áreas coradas em vermelho, e visualizadas por polarização, foram observadas nos cortes histológicos dos tecidos incisados, revelando apenas a presença do colágeno tipo I. Sua análise quantitativa nos processos reparacionais, verificada imediatamente após as incisões (tempo zero) e nos intervalos de 24, 48 e

72h, mostrou que não houve diferença estatisticamente significante entre todas as técnicas. Após 7 dias, a quantidade de colágeno observada na incisão com bisturi convencional foi significativamente maior em relação à incisão com o bisturi elétrico ($P = 0,015$), mas não houve diferença estatisticamente significante entre outras técnicas ($P > 0,05$). Após 14 dias, não houve diferença estatística entre todas as técnicas. Estes dados estão evidenciados na Figura 5.5.

Figura 5.5 – *Pele*. Quantificação de colágeno na derme de ratos

5.3.2 Língua

De forma semelhante à derme, somente foram observadas a presença do colágeno tipo I nos cortes histológicos dos tecidos incisados da língua. A quantificação de colágeno nos processos reparacionais, verificada imediatamente após as incisões e nos intervalos de 24, 48 e 72h, revelou que não houve diferença estatisticamente significante entre todas as incisões. Após 7 dias, a quantidade de colágeno observada na incisão com o bisturi convencional foi significativamente

maior em relação às incisões com lasers de CO₂ 2W e bisturi elétrico ($P = 0,0208$) e menor em relação às incisões com lasers de diodo 4W, mas não houve diferença estatisticamente significativa entre outras técnicas ($P > 0,05$). Após 14 dias, não houve diferença estatística entre todas as técnicas. Estes dados estão representados na Figura 5.6.

Figura 5.6 - Língua. Quantificação de colágeno na língua de ratos

6 DISCUSSÃO

A introdução do *laser* na área médica resultou em avanço no tratamento de diversos tipos de lesões cutâneas e mucosas. O primeiro tipo de *laser* a ser utilizado com finalidade cirúrgica em lesões da mucosa oral foi o *laser* de CO₂. Estudos experimentais e clínicos têm confirmado a utilidade do *laser* de CO₂ no tratamento cirúrgico de neoplasias benignas e malignas, e lesões potencialmente cancerizáveis, de envolvimento oral ou cutâneo (GÁSPÁR, 1994; LUOMANEN; MEURMAN; LEHTO, 1987; ROODENBURG et al., 1991). Um outro tipo de *laser*, o de diodo de alta potência, disponível comercialmente na década de 90, também possui aplicação cirúrgica, além de proporcionar redução de infecção bacteriana pelo seu efeito térmico e sua facilidade de aplicação por meio de fibra óptica, permitindo seu uso na periodontia e endodontia (MORITZ et al., 1997a; MORITZ et al., 1998; MORITZ et al., 1997b).

Embora com ampla aplicabilidade no tratamento de lesões cutâneas e mucosas, os efeitos térmicos dos *lasers* também produzem danos teciduais, que podem retardar o processo reparacional. Estudos a este respeito têm sido realizados por análise morfométrica, comparando danos teciduais resultantes dos *lasers*, de bisturi elétrico e convencional. A contribuição do presente estudo baseou-se na análise do processo reparacional em pele e mucosa oral de ratos submetidos a incisões de dimensões padronizadas, realizadas com *lasers* (CO₂ e diodo), com bisturi elétrico e convencional. As formas de análise das fases de reparação entre as incisões foram baseadas na extensão do dano tecidual ocorrido imediatamente após as incisões, e pela quantificação de mastócitos e de colágeno tipo I em múltiplas

etapas da reparação, gerando um conjunto de dados que permitiram uma análise abrangente comparativa da reparação tecidual entre as técnicas utilizadas.

O primeiro aspecto analisado, o dano tecidual (área de necrose) em pele, mostrou que os *lasers* (independente da potência utilizada) e o bisturi elétrico causaram dano tecidual semelhante. A área de necrose com o bisturi convencional foi, como esperado, significativamente menor do que a observada nas outras incisões (*lasers* e bisturi elétrico). Em termos reparacionais, a existência de dano tecidual extenso resulta em retardo no processo de reparação e ocorrência de defeito cicatricial. Após 7 dias, foi observado que somente a incisão realizada com bisturi convencional apresentava reepitelização já finalizada por exame visual, e após 14 dias, a reepitelização também era verificada nas outras incisões (*lasers* e bisturi elétrico). Outros autores concluíram que os *lasers* de alta potência e bisturi elétrico tendem a apresentar um processo reparacional mais demorado em razão do efeito térmico gerado por estes instrumentos (LUOMANEN; LEHTO; MEURMAN, 1988).

Já em língua, o dano tecidual verificado nas incisões com *lasers* de CO₂ 2 W, diodo 4 W e com bisturi elétrico, foi mais intenso se comparado com o bisturi convencional. Todavia, não houve diferença significativa do dano tecidual dos *lasers* de CO₂ 4 W e de diodo 2 W comparado-os com o causado pelo bisturi convencional. As explicações do fato do *laser* CO₂ com potência de 2 W ser mais lesivo do que o de 4 W em relação ao bisturi convencional, está associado ao tempo de incisão nas dimensões desejadas, ocorrendo maior rapidez e eficiência de corte para o CO₂ com potência de 4 W, conseqüentemente produzindo menor dano tecidual. Em relação ao *laser* de diodo 2 W, o dano térmico tecidual não foi significativamente maior comparado ao do bisturi convencional. Esta constatação está associada à

propriedade do *laser* de diodo 2 W atingir um mesmo grau de eficiência de corte, mesmo com potências mais baixas. Utilizando o parâmetro de 4 W, a agressão térmica é intensa, o que resulta em maior dano tecidual, aspecto também observado no estudo de Romanos et al. (2004). A comparação entre os *lasers*, e destes com o bisturi elétrico, mostram que os danos teciduais ocorreram de forma semelhante. Da mesma maneira como o ocorrido na pele, após 7 dias, foi notado que somente a incisão realizada com bisturi convencional estava reepitelizada, e após 14 dias, as outras incisões (*lasers*, bisturi elétrico) também se encontravam reepitelizadas.

Os dados experimentais obtidos na língua, demonstrando que os *lasers* de CO₂ com potência 4 W e diodo com potência de 2W são menos lesivos, estão de acordo com nossas observações clínicas, e o uso desses aparelhos com essas potências resultam num pós-operatório e cicatrização mais favorável ao paciente. Este melhor desempenho está relacionado às densidades de potência, com energia suficiente para aquecer o tecido, levando à temperatura de vaporização. Este tecido é vaporizado antes que qualquer acúmulo de calor seja propagado para as áreas adjacentes (WILDER-SMITH et al., 1995).

Em termos comparativos dos efeitos de danos teciduais ocorridos na pele e mucosa, esta não sofreu dano térmico tão extenso quanto o da pele. Estes efeitos diferentes entre pele e mucosa oral (dorso de língua) resultam do percentual de água existente na mucosa, que é maior que o da pele. O comprimento de onda do *laser* de CO₂ é absorvido pela água. A presença de maior quantidade de água na mucosa oral aumenta a absorção de *laser* de CO₂, aspecto que diferencia a ação desse *laser* na mucosa oral e na pele, onde o dano térmico é mais evidente. O *laser* de diodo apresenta alta absorção em tecido vascularizado, que se apresenta em maior quantidade nas mucosas que na pele, por isso, há uma melhor absorção

desse *laser* pelo tecido da mucosa oral, reduzindo o espalhamento da luz nos tecidos, gerando menor dano térmico (GUTKNECHT; FRANZEN, 2004).

Esses dados aqui demonstrados, referentes ao dano tecidual, estão de acordo com os obtidos em outros estudos similares (ACLAND et al., 2001; FRIEDMAN; GAL, 1987), nos quais, embora o uso de *lasers* e bisturi elétrico reduza o tempo cirúrgico e sangramento durante as intervenções, as cicatrizes resultantes podem ser mais extensas quando comparadas com as realizadas com bisturi convencional. Sabe-se que o uso do *laser* de CO₂ e de diodo no modo contínuo (como o que foi utilizado neste estudo) em potências altas, não é amplamente utilizado na remoção cirúrgica da maioria das lesões em pele, devido à dificuldade em controlar a vaporização e o dano térmico induzido pelo *laser* em todas extensões dos tecidos, podendo causar cicatrizes hipertróficas (FRIEDMAN; GAL, 1987; GREEN et al., 1992; RIZZO et al., 2004). Para atenuar o dano térmico causado, diversos trabalhos têm demonstrado melhores resultados quando da utilização na pele, do *laser* no modo pulsado ou superpulsado (BERLIN; BILLICK, 2002; FULTON; SHITABATA, 1999; GREEN et al., 1993; SMITH; WINSTANLEY; ROSS, 2005). Os modos pulsado e superpulsado de exposição dos *lasers* não foram usados nesse estudo devido às grandes variáveis de parâmetros destes aparelhos, necessitando de um estudo a parte, além disso, o modo contínuo de exposição é amplamente utilizado na mucosa oral com resultados positivos (BULLOCK, 1995; CHRISTENSON; SMITH; ARPEY, 2000; LUOMANEN, 1992; ROMANOS et al., 2004).

Os achados de quantificação de mastócitos e colágeno tipo I serão discutidos em conjunto devido à inter-relação desses agentes no processo de reparação tecidual. Resultados de estudos mostram que mastócitos, por mecanismo de ação

enzimática (liberação de grânulos contendo enzimas quimases), estimulam fibroblastos na produção de colágeno e, conseqüentemente, atuam no processo de reparação tecidual e remodelação de matriz extracelular. Há suficientes evidências de que os mastócitos atuam nas fases iniciais e tardias do processo cicatricial (PERSINGER et al., 1983; NISHIKORI et al., 1998). Além dessa função, os mastócitos desempenham um papel relevante na fase inflamatória do processo de reparação, na qual ocorre liberação de aminas vasoativas que aumentam a permeabilidade vascular, permitindo o acúmulo de exsudato contendo células fagocitárias no local do trauma, com importante função na diluição de toxinas e remoção de microorganismos e outros contaminantes (LIPSHITS; ZVIAHINTSEVA, 1997; WONG; HOLLINGER; PINERO, 1996).

Neste estudo, a análise desses dois componentes (mastócitos e colágeno tipo I) no processo reparacional na pele, no período de zero a 72h, mostrou aumento significativo no número de mastócitos nas incisões com bisturi convencional em relação às outras incisões, mas não houve diferença significativa na quantificação de colágeno entre todos os tipos de incisões. Utilizando dados da análise do dano tecidual imediatamente pós-incisão, no qual o dano verificado na incisão com bisturi convencional foi menor em relação às outras técnicas, é possível afirmar que o aumento mais significativo de mastócitos na incisão com bisturi convencional é devido a não obliteração de vasos, contrariamente ao que ocorre nas incisões realizadas com *lasers e bisturi elétrico*, resultando num processo reparacional mais acelerado na incisão com bisturi convencional, nesse período inicial. Porém, é possível deduzir também que, o número de mastócitos verificado na técnica convencional não é suficiente para induzir síntese de colágeno (via proliferação de fibroblastos), mesmo que significativamente superior ao que fora quantificado nas

outras incisões. Esses dados mostram que o dano térmico causado pelos *lasers* e bisturi elétrico pode induzir a um atraso no processo reparacional no período inicial, devido a uma maior necessidade de remoção do tecido necrótico produzido por esses instrumentos. Todavia, como não houve diferença na quantificação de colágeno entre as incisões, representa um dado indicativo de que a reparação entre todas as técnicas tendem a se processar de forma semelhante. Do 7º ao 14º dia, a observação do processo de remodelação tecidual, que se inicia em uma fase mais tardia (ao redor do 7º dia), mostrou que as incisões realizadas com bisturi convencional apresentaram maior quantidade de colágeno somente em relação ao bisturi elétrico, indicando que o processo de reparação nessa fase tende a ser mais demorado nas incisões produzidas com esse instrumento. No 14º dia, não houve diferença nas quantificações de mastócitos e colágeno entre todas as técnicas, indicando que a reparação e reepitelização é alcançada em todas as incisões, sem deformidades. Essas observações estão em conformidade com as que foram relatadas por Maurer et al. (2003).

Quanto à língua, o comportamento foi muito semelhante ao verificado na pele, havendo também um aumento no número de mastócitos nas incisões com bisturi convencional em relação às outras técnicas, mas sem ocorrer diferenças significantes na quantificação de colágeno nesse período inicial. O processo de remodelação tecidual, no 7º dia, mostrou que as incisões realizadas com bisturi convencional apresentaram maior quantidade de colágeno comparado ao bisturi elétrico e ao *laser* de CO₂ 2W. Porém, no 14º dia, houve diferença na quantificação de mastócitos entre as técnicas, mas não na quantificação de colágeno. Baseando-se em dados disponíveis na literatura (NISHIKORI et al., 1998), é possível deduzir que os mastócitos presentes nas áreas adjacentes às incisões estejam participando

da reparação tecidual, e que nesta fase, o processo reparacional entre as diferentes incisões ocorre de forma semelhante. A variação quantitativa de mastócitos entre as incisões, não acompanhada por variação significativa de colágeno, indica que sua síntese não é totalmente induzida por mastócitos e que outros fatores possam estar contribuindo nas fase tardias do processo reparacional.

Os dados aqui analisados, referentes ao processo reparacional em pele e língua, não nos permitem afirmar que a velocidade de cicatrização entre as incisões, em ambos os tecidos, se processou em períodos iguais, pois a quantificação de colágeno não indica o momento final da cicatrização e que a densidade de colágeno quantificada não se modifica substancialmente em períodos subseqüentes à cicatrização já finalizada. Ou seja, a quantificação de colágeno determinada em mesmo período para todas as incisões, não constitui um dado fortemente consistente de que a reparação se processou com a mesma velocidade para todas as incisões.

Os instrumentos utilizados neste estudo experimental são de uso constante no tratamento de lesões cutâneas e da mucosa oral, portanto, a análise dos dados neste estudo objetiva também a obtenção de melhores resultados na terapêutica cirúrgica. A pele e mucosa oral apresentaram respostas teciduais diferentes aos instrumentos cirúrgicos utilizados, principalmente em relação ao dano térmico. Em princípio, os efeitos dos *lasers* no modo contínuo e do bisturi elétrico na pele mostram-se mais lesivos que na mucosa, levando a prejuízos na cicatrização, o que restringe sua utilização, considerando-se que o fator estético na pele é prioritário. Sobretudo, na incisão com bisturi elétrico, houve deficiência na formação de colágeno em determinada fase da reparação, tanto em pele como na língua, um

evento que pode, em certas circunstâncias, resultar em atraso e/ou defeito cicatricial, além de expor o tecido a infecções secundárias.

Nossas intervenções em tratamento de lesões cutâneas são restritas, mas, quando são solicitadas, aplicam-se mais especificamente na região de semimucosa labial (vermelhão do lábio), na qual os requisitos estéticos são relevantes. A literatura apresenta vários estudos de *lasers* de CO₂ no tratamento da queilite actínica e outras lesões da superfície lábil (ALAMILLOS-GRANADOS et al., 1993; APFELBERG et al., 1985) com bons resultados estéticos e funcionais. Atualmente, têm-se dado preferência a *lasers* que produzem menor dano térmico, como os pulsados, superpulsados ou interrompidos, indicados para lesões cutâneas e, principalmente, em áreas de importância estética, reduzindo cicatrizações indesejáveis (GREEN et al., 1992; GREEN et al., 1993).

Em relação à mucosa do dorso da língua, os dados mostraram um comportamento semelhante entre as diferentes incisões durante o processo reparacional, embora o bisturi elétrico tenha sido mais lesivo que as outras técnicas e sua indicação em áreas extensas deve ser avaliada mais criteriosamente.

Outro fator que deve ser considerado são as dimensões das incisões realizadas nesse estudo, que são reduzidas se compararmos com as que praticamos em nossa atividade clínica. Muitas lesões da mucosa oral são extensas, isto induz a suposição de que reparações pós-cirúrgicas de lesões orais de grande extensão, resultam potencialmente em formação de cicatriz e comprometimento da função. Assim, instrumentos que produzem dano térmico (*lasers* e bisturi elétrico), utilizados para remoção de lesões extensas, devem, em princípio, induzir formação excessiva de colágeno, resultando em defeito cicatricial. Como visto neste estudo, a análise da densidade de colágeno foi semelhante entre todas as incisões nas fases

tardias da reparação, o que permite considerar que a utilização de bisturi convencional – que não apresenta efeito térmico de dano tecidual – em lesões extensas, não necessariamente produzirá menor quantidade de colágeno e melhor padrão cicatricial, se comparado com as outras técnicas. Ainda, a desvantagem do uso do bisturi convencional em cirurgias extensas é associada ao sangramento e tempo mais longo do ato cirúrgico. Também, como descrito na pele, os *lasers* que causam menos efeito térmico (pulsado e superpulsado) devem ser considerados como opção, em busca da redução de cicatrizações fibróticas.

Dentro do que foi desenvolvido nesse estudo, foi possível observar diferenças nas quantificações de dano térmico, mastócitos e colágeno entre as incisões, porém ao final do processo, o resultado das análises obtidas foi semelhante. O prosseguimento deste estudo deve ser adicionado a tentativas de reproduzir, experimentalmente, atos cirúrgicos à semelhança do que realizamos na atividade ambulatorial, para que se possa definir melhor os instrumentos que dispomos na terapêutica cirúrgica médica e, especificamente, estomatológica. Do ponto de vista morfológico, pode-se acrescentar outros elementos de análise, como a imunohistoquímica, que poderá ser de grande valia para elucidação dos mecanismos que fazem parte do processo reparacional.

7 CONCLUSÃO

Com base na análise dos dados obtidos foi possível concluir que:

1. No período final do processo reparacional, os dados morfométricos foram semelhantes em todas as técnicas, apesar das diferenças ocorridas quanto a área de dano tecidual, quantificação de mastócitos e colágeno tipo I no início do processo.
2. A reparação tecidual tende a se processar dentro de mecanismos semelhantes em incisões padronizadas, independentemente da técnica utilizada; no entanto, variações reparacionais, com técnicas semelhantes, podem estar associadas às características do tecido, como foi observado em pele e mucosa.

REFERÊNCIAS¹

Acland KM, Calonje E, Seed PT, Stat C, Barlow RJ. A clinical and histologic comparison of electrosurgical and carbon dioxide laser peels. *J Am Acad Dermatol* 2001 Mar;44(3):492-6.

Adrian JC. Myofibroblast in healing laser wounds of rat tongue mucosa. *Arch Oral Biol* 1988;33(1):17-23.

Alamillos-Granados F, Naval-Gías L, Dean-Ferrer A, Del Hoyo JRA. Carbon dioxide laser vermilionectomy for actinic cheilitis. *J Oral Maxillofac Surg* 1993;51(2):118-21.

Apfelberg DB, Maser MR, Lash H, White DN. Benefits of the CO₂ laser in oral hemangioma excision. *Plast Reconstr Surg* 1985;75(1):45-50.

Artuc M, Herme B, Steckelings UM, Grutzkau S, Henz BM. Mast cells and their mediator in cutaneous wound healing-active participants or innocent bystanders? *Exp Dermatol* 1999;8:1-16.

Asboe-Hansen G. Hypertrophic scars and keloids. *Dermatology* 1960;120:178-84.

Azaz B, Regev E, Casap N, Chicin R. Sialolithectomy done with a CO₂ laser: Clinical and scintigraphic results. *J Oral Maxillofac Surg* 1996;54:685-8.

Beer TW, Baldwin H, West L, Gallagher PJ, Wright DH. Mast cells in pathological and surgical scars. *Br J Ophthalmol* 1998;82:691-4.

Berlin AL, Billick RC. Use of CO₂ laser in the treatment of periungual fibromas associated with tuberous sclerosis. *Dermatol Surg* 2002 May;28(5):434-6.

Bradley PF. A review of the use of the neodymium YAG laser in oral and maxillofacial surgery. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1997;35(1): 26-35.

Bullock N. The use of the CO₂ laser for lingual frenectomy and excisional biopsy. *Comp Contin Educ Dent* 1995;16(11):1118-23.

¹ De acordo com Estilo Vancouver. Abreviatura de periódicos segundo base de dados MEDLINE.

Christenson LJ, Smith K, Arpey CJ. Treatment of multiple cutaneous Leiomyomas with CO₂ laser ablation *Dermatol Surg* 2000;26(4):319.

Epstein EH Jr. [α 1(III)]₃ human skin collagen, release by pepsin digestion and preponderance in fetal life. *J Biol Chem* 1974;249:3225–31.

Frame JW. Removal of soft tissue pathology with the CO₂ laser. *J Oral and Maxillofac Surg* 1985;43:850-5.

Fisher SE, Frame JW. The effects of the carbon dioxide surgical laser on oral tissues. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1984;22:414-425.

Fisher SE, Frame JW, Browne RM, Tranter RM. A comparative histological study of wound healing following CO₂ laser and conventional surgical excision of canine buccal mucosa. *Arch Oral Biol* 1983;28(4):287-91.

Friedman M, Gal D. Keloid scars as a result of CO₂ laser for molluscum contagiosum. *Obstet Gynecol* 1987 Sep;70(3 Pt 1):394-6.

Fulton JE, Shitabata PK. CO₂ laser physics and tissue interactions in skin. *Lasers Surg Med* 1999;24(2):113-21.

Gáspár L. The use of high-power lasers in oral surgery. *J Clin Laser Med Surg* 1994;12(5):281-5.

Gáspár L, Sudar F, Toth J, Madarasz B. Light microscopical scanning electronmicroscopical, and electronmicroscopical comparing examination of the effect of interventions created in the mouth cavity by means of the surgical scalpel, the electrokauter, and the CO₂ laser ray. *Forgor Sze* 1992;85:39-44.

Green HA, Burd EE, Nishioka NS, Compton CC. Skin graft take and healing following 193-nm excimer, continuous-wave carbon dioxide (CO₂), pulsed CO₂, or pulsed holmium: YAG laser ablation of the graft bed. *Arch Dermatol* 1993;129(8):979-88.

Green HA, Burd E, Nishioka NS, Bruggemann U, Compton CC. Middermal wound healing. A comparison between dermatomal excision and pulsed carbon dioxide laser ablation. *Arch Dermatol* 1992 May;128(5):639-45.

Gutknecht N, Franzen R. *O Laser: função, interação e segurança*. São Paulo: Quintessence Editora Ltda; 2004.

Hendler BHH, Cateno J, Mooar P, Sherk HH. Holmium:YAG laser arthroscopy of the temporomandibular joint. *J Oral Maxillofac Surg* 1992;50:931-4.

Hiromatsu Y, Toda S. Mast cells and angiogenesis. *Microsc Res Tech* 2003;60:64-9.

Hukki J, Lipasti J, Castren M, Puolakkainen P, Schroder T. Lactate dehydrogenase in laser incisions: a comparative analysis of skin wounds made with steel scalpel, electrosurgery, superpulse-continuous wave mode carbon dioxide laser and contact Nd:YAG laser. *Laser Surg Med* 1989;9:589-94.

Iba Y, Shibata A, Kato M, Masukawa T. Possible involvement of mast cells in collagen remodeling in the late phase of cutaneous wound healing in mice. *Int Immunopharmacol* 2004 Dec 20;4(14):1873-80.

Kamamoto F, Paggiaro AO, Rodas A, Herson MR, Mathor MB, Ferreira MC. A wound contraction experimental model for studying keloids and wound-healing modulators. *Artificial Organs* 2003;27(8):701.

Kaminer R, Liebow C, Margarone JE 3rd, Zambon JJ. Bacteremia following laser and conventional surgery in hamsters. *J Oral Maxillofac Surg*. 1990 Jan;48(1):45-8.

Kardos TB, Holt T, Fegurson MM. Histological evaluation of the effect of a miniature carbon dioxide laser on oral mucosa. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1989;18:117-20.

Kischer CW, Bailey JF. The mast cell in hypertrophic scars. *Tex Rep Biol Med* 1972;30:327-38.

Khullar SM, Brodin P, Barkvoll P, Haanæs H. Preliminary study of low-level laser for treatment of long-standing sensory aberrations in the inferior alveolar nerve. *J Oral Maxillofac Surg* 1996;54:2-7.

Liboon J, Funkhouser W, Terris DJ. A comparison of mucosal incisions made by scalpel, CO₂ laser, electrocautery, and constant-voltage electrocautery. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1997;116(3): 379-85.

Lipshits RU, Zviahintseva TV. Intercellular interactions during the healing of an experimental skin wound. *Fisiol Zh* 1997;43(1-2):78-82.

Loiacono D, Shuman D, Darby M, Luton JG. Lasers in dentistry. *Gen Dent* 1993;41:378-81.

Luciano AA, Frishman GN, Maier DB. A comparative analysis of adhesion reduction, tissue effects, and incising characteristics of electrosurgery, CO₂ laser, and Nd:YAG laser at operative laparoscopy: an animal study. *Laparoendoscopic Surg* 1992;2:287-92.

Luomanen M. A comparative study of healing of laser and scalpel incisional wounds in rat oral mucosa. *Scand J Dent Res* 1987;95:65-73.

Luomanen M. Experience with a carbon dioxide laser for removal of benign oral soft-tissue lesions. *Proc Finn Dent Soc* 1992;88:49-55.

Luomanen M, Lehto VP, Meurman JH. Myofibroblasts in healing laser wounds of rat tongue mucosa. *Arch Oral Biol* 1988;33(1):17-23.

Maiman TH. Stimulated optical radiation in ruby. *Nature* 1960;187:493.

Maurer M, Theoharides T, Granstein RD, Bischoff SC, Bienenstock J, Henz B, et al. What is the physiological function of mast cells? *Exp Dermatol* 2003 Dec;12(6):886-910.

Medrado AR, Pugliesi S, Reis SR, Andrade ZA. Influence of low level laser therapy on wound healing and its biological action upon myofibroblasts. *Lasers Surg Med* 2003;32(3):239-44.

Melo JB, Melo GPS. *Laser em Odontologia*. São Paulo: Livraria Santos; 2001.

Migliorati C, Matsumoto C, Eduardo FP, Müller KP, Carrieri TC, Haypek P, et al. The use of low energy lasertherapy in oral mucositis. *J Oral Applic* 2001;1(2):97-101.

Moritz A, Gutknecht N, Schoop U, Goharkhay K, Doertbudak O, Sperr W. Irradiation of infected root canals with diode laser in vivo: Results of microbiological examinations. *Lasers Surg Med* 1997a;21:221-6.

Moritz A, Gutknecht N, Doertbudak O, Goharkhay K, Schoop U, Schauer P et al. Bacterial reduction in periodontal pockets through irradiation with diode laser: a pilot study. *J Clin Laser Periodontol* 1997b;14:130-5.

Moritz A, Schoop U, Goharkhay K, Schauer P, Doertbudak O, Wernisch J, et al. Treatment of periodontal pockets with a diode laser. *Lasers Surg Med* 1998;22:302-11.

Moskalik KG, Kozlov AP, Boiko EV, Ian AV, Novikov SA, Dubaisi I. Potential of different kinds of laser irradiation in treatment of benign and malignant tumors of facial skin. *Vopr Onkol* 2005;51(1):113-6.

Myers TD, Myers WD, Stone RM. First soft tissue study utilizing a pulsed Nd:YAG dental laser. *Northwest Dent* 1989;68(2):14-7.

Myers TD, Murphy DG, White JM, Gold I. Conservative soft tissue management with the low-powered pulsed Nd:YAG dental laser. *Pract Periodontics Aesthet Dent* 1992 Aug;4(6):6-12.

Nelson JS, Berns MW. Basic laser physics and tissue interactions. *Contemp Dermatol* 1988;2:3-15.

Nishikori Y, Kakizoe E, Kobayashi Y, Shimoura K, Okunishi H, Dekio S. Skin mast cell promotion of matrix remodeling in burn wound healing in mice: relevance of chymase. *Arch Dermatol Res* 1998 Oct;290(10):553-60.

Nuebler-Moritz M, Gutknecht N, Sailer HF, Hering P, Prettl W. Ablation of oral mucosa by Erbium:YAG and Holmium:YAG laser radiation. *SPIE* 1997;2973:178-88.

Oishi Y, Fu ZW, Ohnuki Y, Kato H, Noguchi T. Cutaneous Biology Molecular basis of the alteration in skin collagen metabolism in response to in vivo dexamethasone treatment: effects on the synthesis of collagen type I and III, collagenase, and tissue inhibitors of metalloproteinases. *Br J Dermatol* 2002;147(5):859.

Palmer, S.E, McGill, L.D. Thermal injury by in vitro incision of equine skin with electrosurgery, radiosurgery, and a carbon dioxide laser. *Vet Surg* 1992; 21: 348-50.

Patel CKN. Interpretation of CO₂ optical laser experiments. [Letter]. *Physiol Ver* 1964;12:588.

Persinger MA, Lepage P, SIMARD JP, PARKER, GH. Mast cell numbers in incisional wounds in rat skin as a function of distance, time and treatment. Br J Dermatol 1983;108:179-87.

Pick RM, Pecaro BC. Use of the CO₂ laser in soft tissue dental surgery. Laser Surg Med 1987;7:207-13.

Pick RM, Pecaro BC, Silberman CJ. The laser gingivectomy: the use of the laser CO₂ for the removal of phenytoin hyperplasia. J Periodontol 1985;56:492-6.

Pick RM, Powell GL. Laser in dentistry: soft –tissue procedures. Dent Clin N Am 1993;37:281-96.

Pinheiro AL, Neves JC, Castro JFL, Santos JZ, Zanin FA, Oliveira AM. Comparison of the effects of the CO₂ laser and chlorohexidine on the decontamination of infected cutaneous wounds: a histologic study in rats. J Clin Laser Med Surg 2002;20(3):123-7.

Placik OJ, Lewis VL. Immunologic associations of keloids. Surg Gynecol Obstet 1992;175:185-93.

Polanyi TG, Bredemeier HC, Davis TW. A CO₂ laser for surgical research. Med Biol Eng Comput 1970;8:541.

Quinto Jr J. Estudo *in vitro* do esmalte dental irradiado com laser de diodo de alta potência em 960nm: Análise morfológica da superfície dental pós irradiada e análise do comportamento térmico na câmara pulpar devido a aplicação laser [Dissertação de Mestrado Profissionalizante]. São Paulo: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares; 2001.

Rizzo LB, Ritchey JW, Higbee RG, Bartels KE, Lucroy MD. Histologic comparison of skin biopsy specimens collected by use of carbon dioxide or 810-nm diode lasers from dogs. J Am Vet Med Assoc. 2004 Nov;225(10):1562-6.

Romano ACCC. Avaliação *in vitro* das alterações morfológicas da superfície da dentina radicular irradiada pelo laser de CO₂ associado ou não à aplicação de hidróxido de cálcio [Dissertação de Mestrado Profissionalizante]. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares; 2003.

Romanos GE, Nentwig GH. Diode laser (980nm) in oral and maxillofacial surgical procedures: clinical observations based on clinical applications. *J Clin Laser Med Surg* 1999;17(5):193-7.

Romanos GE, Pelekanos S, Strub JR. Effects of Nd:YAG laser on wound healing processes: clinical and immunohistochemical findings in rat skin. *Lasers Surg Med* 1995;16(4):368-79.

Romanos GE, Henze M, Banihashemi S, Parsanejad HR, Winckler J, Nentwig GH. Removal of epithelium in periodontal pockets following diode (980 nm) laser application in the animal model: an in vitro study. *Photomed Laser Surg* 2004 Jun;22(3):177-83.

Roodenburg JLN, Bosch JJ, Borsboom PCF. Measurement of the uniaxial elasticity of oral mucosa in vivo after CO₂ laser evaporation and surgical excision. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1990;19(3):181-3.

Ross MH, Rowell LJ. *Histologia – Texto e atlas*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1989.

Rossmann JA, Brown RS, Hays GL, Lusk SS. Carbon dioxide laser surgical therapy for the management of oral leukoplakia: A case report. *Tex Dent J* 1994;111(12):17-21.

Schilling JA. Wound healing. *Surg Clin North Am* 1976;56:859–65.

Shafir R, Slutzki S, Bornstein LA. Excision of buccal hemangioma by CO₂ laser beam. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1977;44(3):347-50.

Smith EP, Winstanley D, Ross EV. Modified superlong pulse 810 nm diode laser in the treatment of pseudofolliculitis barbae in skin types V and VI. *Dermatol Surg* 2005 Mar;31(3):297-301.

Sohn KU. Experimental study on mast cells in the healing process of extraction wound in rats. *J Osaka Dent Univ* 1982;16(2):171-82.
Stein S. CO₂ laser surgery of the cervix, vagina, and vulva. *Surg Clin North Am* 1984;64:885.

Svensson P, Bjerring P, Arendt-Nielsen L, Kaaber S. Quantitative determinations of sensory and pain thresholds on human oral mucosa by argon laser stimulation. *Pain* 1992 May;49(2):233-9.

Trabucchi E, Radaelli E, Marazzi M, Foschi D, Musazzi M, Veronesi AM, et al. The role of masts cells in wound healing. *Int J Tissue React* 1988;10(6):367-72.

Turner RJ, Cohen RA, Voet RL, Stephens SR, Weinstein SA. Analysis of the tissue margins of cone biopsy specimens obtained with "cold knife", CO₂, and Nd:YAG lasers and a radiofrequency surgical unit. *J Reprod Med* 1992;37:607-10.

Uitto J, Pulkkinen L, Chu ML. Collagen in biology of extracellular matrix, blood vessels, and nerves. In: Fitzpatrick TB, editors. *Dermatology in general medicine*. 5th ed. New York: McGraw-Hill; 1999. p.245–59.

Wilder-Smith P, Arrastia AMA, Liaw LH, Berns. Incision properties and thermal effects of three CO₂ lasers in soft tissue. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1995 79(6):685-91.

Wong MEK, Hollinger JO, Pinero GJ. Integrated processes responsible for soft tissue healing. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1996;82(5):475-92.

Yahr WZ, Strully KJ. Blood vessels anastomosis and other biomedical applications. *J Assoc Adv Med Instrum* 1966;1:28.

Zeinoun T, Nammour S, Dourov N, Aftimos G, Luomanen M. Myofibroblasts in healing laser excision wounds. *Lasers Surg Med* 2001;28(1):74-9.

Zimmermann M. Studies on the therapeutic efficacy of a HeNe laser *Dtsch Z Mund Kiefer Gesichtschir* 1990 Jul-Aug;14(4):313-9.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIAPROTOCOLO nº 08/04
PARECER nº 08/04

Com base em parecer de relator, o Comitê de Ética em Pesquisa – Subcomissão de Bioética de Animais da FOU SP, **APROVOU** o protocolo de pesquisa *“Reparação tecidual por análise morfológica, histoquímica e imunohistoquímica em tecido cutâneo e oral de ratos após cirurgia com laser de CO₂ e Diodo, bisturi elétrico e convencional”*, de responsabilidade da pesquisadora **Luciane Hiramatsu Azevedo**, sob orientação do Professor Doutor **Dante Antonio Migliari**.

Cabe ao responsável enviar relatórios referentes ao andamento da pesquisa após 06 (seis) meses e 01(um) ano desta data, bem como cópia do trabalho em “cd” ou “disquete” ao finalizá-lo, conforme legislação vigente.

São Paulo, 22 de abril de 2004

Prof. Dr. **CELSONO LUIZ CALDEIRA**

PRESIDENTE DA SUBCOMISSÃO DE BIOÉTICA DE ANIMAIS DA FOU SP