

**Estela de Souza Soares**

**EFEITOS DA LASERTERAPIA DE  $\lambda$ 660nm E  $\lambda$ 830nm NA  
CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CIRÚRGICAS:  
ESTUDO HISTOLÓGICO E IMUNOCITOQUÍMICO.**



**PROGRAMA INTEGRADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
Área de concentração:  
Laser em Odontologia**

**Salvador**

**2006**

S676 Soares, Estela

Efeitos da laserterapia de  $\lambda 660\text{nm}$  e  $\lambda 830\text{nm}$  na cicatrização de feridas cirúrgicas: estudo histológico e imunocitoquímico / Estela Soares. – Salvador, 2006.

128 f.

Orientador: Antonio Luiz Barbosa Pinheiro

Co-Orientador: Jean Nunes dos Santos

Tese (Doutorado) – Universidade Federal da Bahia,  
Universidade Federal da Paraíba, 2006.

1. Regeneração tecidual. 2. Laserterapia. 3. Cirurgia com laser de  $\text{CO}^2$ . I. Pinheiro, Antonio Luiz Barbosa dos Santos. II. Santos, Jean Nunes dos. III. Universidade Federal da Bahia. IV. Universidade Federal da Paraíba. V. Título.

CDU 616.314:621.375

À pessoa mais importante em minha vida, exemplo de dignidade, força e amor; dedico este trabalho à minha grande amiga, minha mãe, **Lindalva Maria de Souza Soares.**

## AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia.

À Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Paraíba.

Ao Hospital Universitário Professor Edgar Santos.

Ao meu Orientador, Professor Doutor Antônio Luiz Barbosa Pinheiro, com seu exemplo de competência, foi responsável por minha escolha na estrada ciência, incentivador dos meus primeiros passos e eterno merecedor de minha admiração, respeito, gratidão e carinho.

Ao meu Co-orientador, Professor Doutor Jean Nunes dos Santos, pela atenção sempre disponível e por compartilhar comigo seus valiosos conhecimentos.

À todos os professores deste programa, que colaboraram na construção dos conhecimentos necessários para a realização deste trabalho e para o início de minha vida acadêmica.

Aos coordenadores Edmar Borges de Santana e João Lino da Costa.

Ao Professor Doutor João Lino da Costa, por sua compreensão, e por suas atividades profissionais, sempre solícito e atencioso.

Aos meus colegas do doutorado: Aparecida M. Cordeiro Marques; Márcia Sepúlveda Noya, Francisco de Assis Limeira Júnior, João Batista Sobrinho, Gardênia

Zumaêta, que formando um grupo coeso, unidos por um ideal, fortes companheiros que enfrentamos todas as vicissitudes desta caminhada. Agradeço por todo apoio e trocas de experiência, meu eterno respeito e admiração pessoal e profissional.

À amiga Professora Doutora Marleny M. Gerbi que com sua experiência e sempre me foi solícita com seus ensinamentos e colaboração na execução das cirurgias deste estudo. Sem dúvida, seu exemplo foi um dos maiores incentivos que tive nesta caminhada que hoje inicio.

À CD Thaís Gonçalves pela valiosa colaboração na execução desta pesquisa e por seu carinho e disposição, pronta para trabalhar quando necessário.

Aos alunos que fazem parte do grupo de pesquisa do professor Antônio Pinheiro, sobretudo à Carolina Montagn e Manuela Noia que foram indispensáveis nos procedimentos experimentais.

Aqueles que fazem parte do laboratório de imunopatologia do  
Professora Helenemari, por me estimular a persistir em meus objetivos e a  
Maria da Graça Vieira, Katherine Astete Gómez e Juçara Maria Souza de Andrade pela  
colaboração e ensinamentos sobre imunocitoquímica os quais me foram fundamentais  
na realização desta técnica e pelo coleguismo que levarei comigo nesta caminhada.

À minha amiga Conceição Costa, pela acolhida em minha passagem pela cidade de João pessoa e por suas palavras de incentivo que nunca me faltaram.

Ao Exército Brasileiro, nas pessoas do comando do HGeS, TC Mendes e do Subcomandante TC Paulo Roberto .

Ao TC Torres, aos meus colegas Oficiais-Dentistas e a todos que fazem parte da Odontoclínica do HGeS, meus sinceros agradecimentos pela compreensão e camaradagem que nunca me faltaram.

A Marcos por ser solícito e profissional quando precisei fornecendo-me material necessário para a execução deste experimento.

À Professora Maria Rita do departamento de Farmácia da Universidade Federal da Bahia, por me ceder os animais utilizados neste experimento.

À Maria de Lourdes Santos Silva, obrigada pelo seu valioso trabalho no laboratório de patologia o qual desempenhou com muito profissionalismo e simpatia.

A Julian Esteban Lavin Gutierrez, pelo seu amor e companheirismo.

À amiga, irmã de coração, Adriana Santana, pela cumplicidade, apoio e amor que me fazem uma pessoa melhor a cada dia.

À Miriã Figueiredo, por ser minha família nesta terra, pela amizade e compreensão e com a qual sempre pude contar.

Ana Clébia Rocha pelo carinho e amizade que me fizeram forte nos momentos de dificuldades.

À Fátima Costa, pelo acolhimento em sua família, pela amizade e pelos momentos de descontração.

Alicerces do que sou hoje e do que ainda poderei ser, a minha família: Minha Mãe, Lindalva Maria de Souza Soares; meus irmãos: Hildete, Denise, Fábio, Gilson e a todos meus sobrinhos representados por Marcella Lima Soares.

A Deus, por sempre me reservar dentro dos mistérios do universo, momentos valiosos de muita felicidade e, sobretudo, agradeço por me dar discernimento para subtrair grandes aprendizados em meio a tantas dificuldades.

*“Há duas formas para viver a vida:  
Uma é acreditando que não existe milagre.  
A outra é acreditando que todas as coisas são milagre”*

*Albert Einstein*



## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS</b>	10
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	13
<b>LISTA DE QUADROS E TABELAS</b>	17
<b>RESUMO</b>	18
<b>ABSTRACT</b>	19
<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b>	20
Reparo de feridas cutâneas	22
Laser	29
Interações teciduais do laser	31
Laser de CO <sub>2</sub>	36
Estudos realizados com laser de CO <sub>2</sub>	40
Efeitos do laser cirúrgico no processo de cicatrização	53
<b>PROPOSIÇÃO</b>	66
<b>METODOLOGIA</b>	67
Equipamentos utilizados	68
Modelo experimental	70
Descrição da amostra do estudo	71
Técnica cirúrgica	72
Laserterapia	74
Obtenção da amostra tecidual	76
Processamento histológico	76
Procedimento Imunohistoquímica	77

Técnica de Imunocitoquímica	78
Recuperação antigênica	79
Bloqueio da peroxidase endógena	79
Incubação do anticorpo primário	80
Incubação do anticorpo secundário	80
Contracoloração e montagem	80
Análise Histológica	81
Análise Imunocitoquímica	82
<b>RESULTADOS</b>	83
<b>DISCUSSÃO</b>	97
<b>CONCLUSÃO</b>	113
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	114
<b>ANEXOS</b>	
Aprovação da Pesquisa no comissão de Ética do Laboratório de Pesquisa Experimental da FOUFBA	126
Coloração de Picrosírius	127
<b>APÊNDICE</b>	
Critérios de avaliação histológica e Imunocitoquímica	128

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AMP	-	Adenosin monophosphate (Adenosina monofosfato)
AMP <sub>C</sub>	-	Adenosin monophosphate Cyclic (Adenosina monofosfato cíclico)
Ar	-	Argônio
ATP	-	Adenosin triphosphate (Adenosina trifosfato)
Å	-	Ängstron
cm	-	Centímetro
cm <sup>2</sup>	-	Centímetro quadrado
CO <sub>2</sub>	-	Dióxido de Carbono
CW	-	Contínuos Wave (Onda Contínua)
°C	-	Grau centígrado
DAB	-	Diamiobenzidina
D	-	Densidade de Energia
DP	-	Densidade de Potência
Er	-	Érbio
Er:YAG	-	Érbio:Ytrio-Alumínio-Granada
g	-	Gramma
GA	-	General Anestyesic (Anestesia geral)
GaAs	-	Arseneto de Gálio
GaAlAs	-	Arseneto de Gálio e Alumínio
HeCd	-	Hélio-Cádmio
HeNe	-	Hélio-Neônio

H&E	-	Hematoxilina e Eosina
HGeS	-	Hospital Geral de Salvador
Ho-YLF	-	Hólmio:Fluoreto de Ítrio Lítio
HUPES	-	Hospital Universitário Professor Edgar Santos
Hz	-	Hertz
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-	Peróxido de Hidrogênio
J	-	Joule
J/cm <sup>2</sup>		Joules por centímetro quadrado
J/s X cm <sup>2</sup>		Joules por segundo por centímetro quadrado
LASER	-	Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation
MEC	-	Matriz Extracelular
mJ	-	MiliJoule
mm	-	Milímetro
mm <sup>2</sup>	-	Milímetro quadrado
mm <sup>3</sup>	-	Milímetro cúbico
mW	-	MiliWatt
nm	-	Nanometro
N	-	Nitrogênio
NADH	-	Nicotinamide Adenine Dinucleotide (Nicotinamida Adenina Diunucleotídeo)
Nd:YAG	-	Neodímio:Ytrio-Alumínio-Granada
n°	-	Número
PBS	-	Phosphate buffered saline (Solução tampão salina)
RSP	-	Rapid Superpulse (Modo de produção em super pulso)

s	-	Segundos
SMA	-	Smooth Muscle Actin (Actina de músculo liso)
T	-	Tempo
TGF $\beta$	-	Basic Tumor Growth Factor (fator básico de crescimento tumoral)
TRIS-HCL	-	Trihidroximetil aminometano-ácido clorídrico
UFBA	-	Universidade Federal da Bahia
UFPB	-	Universidade Federal da Paraíba
V	-	Velocidade
W	-	Watt
W/ cm <sup>2</sup>	-	Watt por centímetro quadrado
$\mu$ m	-	Micrometro
$\mu$ l	-	Microlitro
$\lambda$	-	Comprimento de onda
®	-	Marca registrada

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Perfil especial Gaussiano de um feixe de laser e sua interação com o tecido (FONTE: Freitas 2000)

**Figura 2.** Aparelho laser de CO<sub>2</sub>, modelo 20C (Sharplan, Israel) (Soares, 2006)

**Figura 3.** Aparelho laser diodo modelo BioWave (Kondortech, São Carlos, SP)

**Figura 4.** Excisão com bisturi (Soares, 2006)

**Figura 5.** Remoção da derme com bisturi (Soares, 2006)

**Figura 6.** Excisão com LASER (Soares, 2006)

**Figura 7.** Primeira irradiação com laser diodo vermelho (Soares, 2006)

**Figura 8.** Fragmento de pele do espécime do grupo controle de bisturi, ao décimo quarto dia. Momento da biópsia (Soares, 2006)

**Figura 9.** Fotomicrografia de espécime do subgrupo 3A. Formação epitelial com início da camada de queratina (H&E, 100x) (Soares, 2006)

**Figura 10.** Fotomicrografia do espécime do subgrupo 4A. Deposição colagênica, apresentando fibras imaturas, fragmentadas e intercaladas. (Picrosírius 100x) (Soares, 2006)

**Figura11.** Fotomicrografia de espécime do subgrupo 5A. Deposição colagênica, com fibras delgadas, imaturas e pouco fragmentadas (Picrosírius 100x) (Soares, 2006)

**Figura 12.** Fotomicrografia de espécime do subgrupo 6A: Maior deposição colagênica, com fibras colágenas menos delgadas e pouco fragmentadas (Picrosírius 100x) (Soares, 2006)

**Figura 13.** Fotomicrografia de espécime do subgrupo 1B. Observar na área central da ferida formação de colágeno imaturo em relação à derme adjacente (Picrosírius, 100x) (Soares, 2006)

**Figura 14.** Fotomicrografia de espécime do subgrupo 3B. Verificar maior semelhança do Colágeno recém formado na área da ferida com o Colágeno da derme adjacente (Picrosírius, 40X) (Soares, 2006).

**Figura 15.** Fotomicrografia de espécime do subgrupo 4B. Presença de colágeno na região da ferida imaturo com relação à derme adjacente. (Picrosírius, 40X) (Soares, 2006)

**Figura 16.** Fotomicrografia de espécime do subgrupo 5B. Maior semelhança do colágeno neoformado com o da derme adjacente, além de presença de adipócitos.(Picrosírius, 40x) (Soares, 2006)

**Figura 17.** Fotomicrografia de espécime do subgrupo 1C. Fibras colágenas neoformadas em organização (H&E 100x) (Soares, 2006).

**Figura 18.** Fotomicrografia de espécime do subgrupo 2C. Matriz colagênica marcadamente organizada entremeada por Fibroblastos paralelamente à superfície, revestida por epitélio com interface plana (H&E 100x) (Soares, 2006).

**Figura 19.** Fotomicrografia de espécime do o subgrupo 1C, Organização colagênica da região da ferida diferente da derme adjacente. (Picrosírius, 100x) (Soares, 2006)

**Figura 20.** Fotomicrografia de espécime do subgrupo 2C. Extrema semelhança das fibras colágenas neoformadas com aquelas da derme adjacente. (Picrosírius, 100x) (Soares, 2006).

**Figura 21.** Fotomicrografia de espécime do subgrupo 2A. Presença de Miofibroblastos fusiformes imunomarcados pela  $\alpha$ -actina. (SABC, 400x) (Soares, 2006).

**Figura 22.** Fotomicrografia de espécime do subgrupo 3A. Presença de Miofibroblastos ovulares imunomarcados pela  $\alpha$ -actina (SABC, 400X) (Soares, 2006)

**Figura 23.** Fotomicrografia de espécime do subgrupo 3A. Presença marcante de Fibroblastos imunomarcados pela vimentina (SABC, 100x) (Soares, 2006)

**Figura 24.** Fotomicrografia de espécime do subgrupo 2B. Grande quantidade de Miofibroblastos imunomarcados pela  $\alpha$ -actina (SABC, 200X) (Soares, 2006)

**Figura 25.** Fotomicrografia de espécime do subgrupo 1C. Presença de únic Miofibroblasto imunomarcado pela  $\alpha$ -actina (SABC, 200X) (Soares, 2006)

**Figura 26.** Fotomicrografia de espécime do subgrupo 3C. Grande quantidade de Fibroblastos, paralelos e próximos a superfície epitelial imunomarcados pela Vimentina (SABC, 200X) (Soares, 2006)



## LISTA DE QUADRO E TABELAS

**QUADRO 1.** Classificação das variáveis do estudo (Soares, 2006)

**QUADRO 2.** Distribuição dos grupos de estudo (Soares, 2006)

**QUADRO 3.** Resultados Histológicos (Soares, 2006)

**1.**

Superfície histológica dos reparos (Soares, 2006)

## RESUMO

Os lasers têm sido usados em diversas especialidades médicas por mais de uma década. Um dos lasers mais usados na Odontologia é o laser do CO<sub>2</sub>, o qual tem uma excelente absorção em tecidos bucais, por isso é largamente utilizado em cirurgia de tecidos moles. Além dos lasers cirúrgicos, a laserterapia tem sido usada com sucesso em diversas circunstâncias como no combate a dores e em reparo de feridas. Neste estudo foram utilizados 54 ratos machos (*Ratus norvegicus albinus*, linhagem Wistar) com cerca de 8 semanas e pesando em média 250g, mantidos em ciclos de dia/noite de iluminação e temperatura ambiente. Os animais foram mantidos em caixas plásticas em grupos de três e alimentados com dieta padronizada, com água "*ad libitum*". Sob GA (hidrato de Cloral de 10%) foi realizada ferida padronizada no dorso dos animais previamente tricotomizados, utilizando bisturi convencional (grupos 1, 2 e 3) ou com o laser do CO<sub>2</sub> Sharplan, 20C, 5W, RSP (grupos 4, 5, e 6). Os grupos 1 e 4 foram os controles, os grupos 2 e 5 foram tratados com a terapia a laser de  $\lambda 660\text{nm}$  (20J/cm<sup>2</sup>, 30mW, diâmetro de 3mm) e os grupos 3 e 6 foram tratados com laserterapia de  $\lambda 830\text{nm}$  (20J/cm<sup>2</sup>, 40mW, diâmetro de 3mm). A terapia do laser foi aplicada transcutaneamente em quatro pontos em torno da ferida e começada imediatamente depois da cirurgia, repetida no dia seguinte e depois a cada 48h durante o tempo experimental (3, 8 ou 14 dias). Os animais foram sacrificados dentro dos princípios da bioética, com *overdose* do anestésico geral e os espécimes foram processados para exame histológico, corados em H&E, Picrosirius e imunomarcados com  $\alpha$ -actina e Vimentina. A análise histológica foi baseada em diversos aspectos do processo de reparo como: reepitelização, formação de colágeno, edema, neovascularização, infiltrado inflamatório, presença do miofibroblastos e fibroblastos. Os resultados evidenciaram reparo mais precoce no grupo 2, bem como maior maturação da matriz colagênica e aceleração da resposta inflamatória foram vistos em todos os grupos irradiados quando comparado a seus controles. A imunomarcação evidenciou menor presença de miofibroblastos em feridas feitas com laser do CO<sub>2</sub> quando comparado àquelas executadas com bisturi. O estudo concluiu que a laserterapia ofereceu um melhor padrão histológico de reparo, com uma formação mais avançada de colágeno, uma resposta inflamatória mais rápida e menor formação de edema, assim como menor contração e formação de cicatriz em feridas realizadas com laser de CO<sub>2</sub>.

## ABSTRACT

Lasers have been used in several medical specialties for more than a decade. Amongst the most used lasers in Dentistry is the CO<sub>2</sub> laser, which is a laser which has a very good absorption by the oral tissues and is widely used to perform several surgical procedures mainly on soft tissues. Besides the surgical lasers, laser therapy has been used successfully to improve and treat several conditions. Amongst them, it has been widely used to improve wound healing. Fifty-four male Wistar rats (*Ratus norvegicus albinus Wistar*) average 8 weeks and averaged weight of 250mg were kept on day/night cycles of illumination and at environmental temperature. The animals were kept on plastic cages in groups of three and were fed with standard laboratory pelleted diet and had water “*ad libitum*”. Under GA (10% Chloral Hydrate ) the animals had a standard wound made on their dorsum either with the scalpel (groups 1, 2 and 3) or with the CO<sub>2</sub> Laser (Sharplan, 20C, 5W, CW, RSP; groups 4, 5, and 6). Groups 1 and 3 acted as controls, groups 2 and 5 were also treated with laser therapy with  $\lambda 660\text{nm}$  (20J/cm<sup>2</sup>, 30mW, diameter of 3mm) and groups 3 and 6 were treated with  $\lambda 830\text{nm}$  laser light (20J/cm<sup>2</sup>, 40mW, 3mm). Laser therapy was applied transcutaneously in four points around the wounded site and started immediately after surgery and was repeated at every 48h during the experimental time (3, 8 or 14 days). The animals were humanely killed with an overdose of general anesthetic and specimens taken for histology. The specimens were routinely processed to wax, cut and stained with H&E, Picrosirius and immunomarked  $\alpha$ -actin. The histological analysis was based on several aspects of the healing process: re-epithelization, collagen formation, edema, neovascularization, inflammatory infiltrate, presence of myofibroblast and fibroblast. The results evidenced a more precocious healing on group 2 and a advanced maturation of the collagen matrix and advanced inflammatory response was seen on all irradiated groups when compared to their controls. Immunomarking evidenced a minor presence of myofibroblast on CO<sub>2</sub> laser wounds when compared to the ones performed by the scalpel and less scarring. It is concluded that laser therapy resulted in a better repair with a more advanced collagen formation, quick inflammatory response and less edema. Laser wounds less contraction and no scarring.

## REFERENCIAL TEÓRICO

O reparo de feridas dérmicas consiste em um processo complexo que passa por algumas etapas e o resultado final dependerá de alguns fatores tais quais o processo que a originou e o seu tratamento posterior. Os estudos sobre laser em processos de reparo de feridas visam, através do controle de suas etapas, oferecer um melhor padrão de cicatrização.

A fotoablação é uma manifestação térmica produzida pelos lasers cirúrgicos, dentre eles o de CO<sub>2</sub>, e se caracteriza pelo processo de remoção de tecido através de sua vaporização, devido ao superaquecimento dos fluidos tissulares, levando a hemostasia do tecido irradiado (BRUGNERA JÚNIOR; PINHEIRO, 1998; PIMENTA, 1990 *Apud* VARANDAS; GENOVESE, 2000).

Atualmente, o laser de CO<sub>2</sub> é considerado um recurso importante dentro da cirurgia odontológica. Isto se deve a grande afinidade de seu comprimento de onda aos fluidos tissulares, oferecendo inúmeras vantagens tais quais: boa coagulação, dispensar sutura, minimizar desconforto pós-operatório, entre outras. Estas vantagens do laser de CO<sub>2</sub> possibilitam sua utilização em cirurgias extensas de tecido moles na boca, onde se torna difícil à realização de sutura e assim oferece reparação do leito cirúrgico por segunda intenção, diminuindo o tempo cirúrgico e a perda de sangue (VARANDAS; GENOVESE, 2000; BRUGNERA JÚNIOR; PINHEIRO, 1998; NICCOLI-FILHO *et al.*,

1998). Também é característica de feridas realizadas a laser a pequena ou ausente contração do tecido reparado quando, comparadas as feridas realizadas com bisturi. Esta contração acontece, principalmente em excisões, onde há grande perda de tecido e seu objetivo é a aproximação das bordas da ferida, porém, pode resultar em formação de cicatriz. Este fenômeno se deve a considerável diminuição ou ausência dos miofibroblastos, os quais são fibroblastos com características de células musculares lisas (FREITAS, 2000). Para Sanders e Reinisch (2000), além da hemostasia e da menor formação de cicatriz, acreditam ainda em outros benefícios do laser de CO<sub>2</sub> como esterilização imediata das feridas cirúrgicas.

Apesar dos inúmeros benefícios da realização de cirurgias com laser de CO<sub>2</sub>, o aumento de temperatura provocado aos tecidos vizinhos acarreta retardo no processo de reparo devido a maior destruição de colágeno dos tecidos circunvizinhos e maior área de necrose quando comparado a incisões com bisturi convencional (RALDI *et al.*, 1999).

Uma gama de técnicas tem sido estudada para minimizar estas injúrias térmicas causados pelo laser de CO<sub>2</sub>. Para Sanders e Reinisch (2000), um dos parâmetros importantes e responsáveis pelo superaquecimento dos tecidos irradiados por laser de CO<sub>2</sub> tem sido a duração do pulso.

Por outro lado, os lasers não cirúrgicos ou não-ablativos possuem propriedades de biomodulação decorrentes do efeito fotoquímico, o qual consiste na ação da luz sobre os processos moleculares e bioquímicos normalmente existentes nos tecidos. Um exemplo deste efeito fotoquímico é a aceleração da fase inflamatória que ocorre nos

processos de reparos de tecidos moles, bem como modulação nos processos de proliferação celular e formação de colágeno (BRUGNERA JÚNIOR; PINHEIRO, 1998). A biomodulação fornecida pelo laser é de natureza fotobiológica e envolve a cadeia respiratória mitocondrial, induzindo mudanças nos níveis do AMPc (Adenosina monofosfato cíclico) que é um nucleotídeo cíclico que possui funções regulatórias em diversos processos metabólicos (KARÚ, 1987).

Existem evidências clínicas de que a biomodulação proporcionada pelo laser não cirúrgico pode minimizar os danos térmicos causados pelo laser de CO<sub>2</sub>, regulando a reação inflamatória e incrementando a formação de colágeno, acelerando o processo de reparo de cirurgias a laser (BRUGNERA JÚNIOR; PINHEIRO, 1998). E foi neste sentido que direcionamos nossa investigação, acreditando na obtenção de melhores resultados no processo de reparo quando associado a laserterapia de baixa intensidade nas cirúrgicas com laser de CO<sub>2</sub>.

#### ➤ **Reparo de feridas cutâneas**

Qualquer solução de continuidade na pele pode ser chamada de ferida e, tanto a regeneração quanto a cicatrização são determinados por mecanismos essencialmente similares, envolvendo a migração, proliferação e diferenciação celulares, bem como interação entre as células e a matriz (COTRAN *et al.*, 1999).

O reparo de feridas dérmicas passa por três fases antes do seu reparo completo, sendo elas: a fase inflamatória; fase fibroblástica e a fase de remodelamento ou

cicatricial. A fase inflamatória prepara a ferida para a cicatrização e remove restos celulares e tecidos desvitalizados. A fase fibroblástica reconstrói as estruturas danificadas e proporciona força tensil à ferida. Finalmente, a fase de remodelamento modifica a cicatriz imatura para uma madura, a fim de ajustar-se ao tamanho da ferida e também dá forma final à lesão. Essas fases são complexas e altamente organizadas. As fases se sobrepõem uma à outra e o final de uma fase estimula o início da outra [...].

A reparação tecidual é a substituição do tecido perdido por tecido de granulação que amadurecerá, originando o tecido cicatricial. Após a agressão sofrida pela derme ocorre uma vasoconstrição arterial fugaz seguida de vasodilatação intensa de capilares e veias locais. Também ocorre a liberação de mediadores químicos e moléculas vasoativas, aumentando a permeabilidade vascular. Há liberação de fatores quimiotáticos que recrutam neutrófilos e leucócitos e estes produzem e liberam mais mediadores inflamatórios. Todo este processo corresponde a uma fase que se denomina didaticamente de fase hemorrágica e o tecido lesado está se preparando para a segunda fase que é a fase inflamatória, em seguida, a fase de regeneração. Sendo assim, após a fase hemorrágica, ocorre a formação do coágulo de fibrina devido à saída de fibrinogênio dos vasos e sua transformação em fibrina (RUBIN; FABER, 1990; MONTENEGRO; FRANCO, 1999). Com a formação da rede de fibrina e conseqüentemente o coágulo, ocorre um aumento do fluxo sanguíneo, aumento da permeabilidade capilar e liberação de histamina pelos mastócitos. Clinicamente estes eventos vão resultar num aumento de volume local (edema) e aumento da temperatura na região. Está Instalado o processo inflamatório agudo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1995). Nesta fase inicial também ocorre à contração é a redução mecânica na dimensão do ferimento, como resultado da ação de

Miofibroblastos, que são células originárias de células perivasculares (pericitos) ou células precursoras mesenquimais. Estas células surgem de dois a três dias após a lesão e sua contração ativa reduz a dimensão do ferimento em até 70% (RUBIN; FABER, 1990).

Após esta fase inflamatória aguda, por volta do sétimo dia após a agressão, as células leucocitárias, fibrina e neutrófilos dão lugar a um exsudato mais rico em linfócitos, macrófagos, fibroblastos, dando origem a um processo mais crônico – formando o tecido de granulação. A matriz extracelular vai ficando mais densa, rica em fibras colágenas devido à deposição de colágeno pelos fibroblastos e corresponde a fase de remodelação e por fim a cicatriz fibrosa (MONTENEGRO; FRANCO, 1999).

A cicatrização de uma ferida será determinada de primeira intenção ou de segunda intenção a depender da natureza da ferida. O reparo de feridas causadas por incisões cirúrgicas, limpas, não infectadas e aproximada por sutura é denominada de cicatrização primária ou por primeira intenção. Este tipo de incisão provoca morte de um número limitado de células e de ruptura da membrana basal epitelial. Este estreito espaço é rapidamente preenchido por sangue coagulado, rico em fibrina. A desidratação deste coágulo forma a conhecida crosta que recobre a ferida protegendo-a (COTRAN *et al.*, 2000; FREITAS, 2000).

No caso da cicatrização por segunda intenção, também conhecida como cicatrização secundária, cicatrização por granulação ou cicatrização chamada aberta ocorre quando há uma perda extensa de tecido, ou seja, quando se origina de excisão. Este processo difere da cicatrização por primeira intenção primeiramente pelo tamanho



do defeito a ser reparado e inicialmente apresenta uma maior quantidade de fibrina, restos necróticos e exsudato a serem removidos, resultando numa reação inflamatória mais intensa, com maior migração de vasos, maior quantidade de tecido de granulação, por conseguinte tornando o processo de reparo mais lento. É o aspecto que difere mais claramente nos dois processos de reparo é a contração da ferida devido a maior migração de miofibroblastos (SHAFER *et al.*, 1987). Grandes feridas em pele de coelho sofrem redução em 5 a 10% de seu tamanho em aproximadamente seis semanas devido à contração. Esta contração tem sido atribuída, pelo menos em parte, à presença de miofibroblastos – fibroblastos alterados que possuem características ultra-estruturais de células musculares lisas (COTRAN *et al.*, 2000).

Os miofibroblastos, fibroblastos com características de músculo liso têm ação de contração nos processos de reparo, cessando quando as bordas da ferida se justapõem (inibição por contato), ou quando a tensão da pele circunjacente à ferida excede a sua força contrátil, ou ainda quando há acúmulo e maturação de colágeno associados à diminuição do número de Miofibroblastos (KOOPMAN, 1995). Os miofibroblastos podem ser evidenciados pelo marcador alfa-actina do músculo liso ( $\alpha$ -SMA), particularmente para o fenótipo que está envolvido nos fenômenos de contração. Outros marcadores que podem evidenciar os miofibroblastos que não estão envolvidos com o fenômeno da contração, como a Vimentina e a Desmina (BADID *et al.*, 2000). Os miofibroblastos são encontrados entre o quarto e o vigésimo segundo dia das feridas das feridas experimentais, com um pico de densidade no oitavo dia. Devido à presença dos miofibroblastos já no quarto dia de reparo, autores recomendam o início das terapias nos primeiros dias do processo de reparo (CORNELISSEN *et al.*, 2000).

Os fibroblastos são a maior fonte de matriz de proteínas que restaura a continuidade do tecido lesado. Dois processos estão envolvidos na fibroplasia: migração e proliferação de fibroblastos e a deposição de matriz extracelular por estas células. A permeabilidade vascular dos vasos neoformados neste tecido de granulação também favorece a deposição de proteínas plasmáticas, como fibrinogênio e fibronectina na matriz extracelular, proporcionando estroma para o crescimento de células endoteliais. A migração dos fibroblastos para o local da lesão e a sua subsequente proliferação são deflagrados por numerosos fatores de crescimento e as denominadas citocinas fibrinogênicas (COTRAN *et al.*, 1999).

À medida que o reparo progride, o número de células endoteliais proliferantes e fibroblastos diminuem. Os fibroblastos progressivamente tornam-se mais sintéticos e depositam quantidades aumentadas de matriz extracelular. Os colágenos fibrilares formam uma importante parte do tecido conjuntivo nos sítios de reparo e são importantes no desenvolvimento da resistência na cicatrização de feridas. A síntese de colágeno pelos fibroblastos começa numa fase relativamente precoce, dentro de três a cinco dias, e prossegue por várias semanas, dependendo do tamanho da ferida (ANDRADE, 1999).

As células da matriz, principalmente os Fibroblastos, sintetizam os colágenos sob a forma solúvel, o protocolágeno que em seguida é clivado e torna-se insolúvel e se agrega ao longo dos outros formando protofibrilas. A reunião destas protofibrilas dá lugar às fibrilas, que por sua vez se agregam formando as fibras, as quais podem ser observadas ao microscópio de luz com a coloração do sítius vermelho. Este corante

evidencia as fibras colágenas, servindo como seu marcador específico microscopia de luz. Todavia, este exame não é adequado para reconhecer diferentes isótopos do colágeno. As fibras são dispostas inicialmente ao acaso, orientadas em várias direções no abundante material amorfo. Este “padrão frouxo” é gradualmente substituído por um “padrão denso” quando as fibras colágenas são compactadas em feixes paralelos e bem orientadas, oferecendo maior resistência à região regenerada, tendo os Fibroblastos uma participação significativa neste processo (ANDRADE, 1999).

O colágeno é uma proteína fibrosa cujo tamanho é  $3000\text{Å} \times 14\text{Å}$  com funções estruturais importantes. Constituem parte importante da matriz extracelular, contribuindo para a preservação da integridade e da forma da maioria dos tecidos biológicos da maioria dos tecidos. As fibras colágenas estão também envolvidos no desenvolvimento embrionário, fenômenos adesivos e de movimentação celular. Há vários isótopos de colágenos conhecidos atualmente, cada um com estrutura própria e finalidade distinta. Os principais tipos de colágeno humano são do I ao IX, cada um em com tecido e função específica. Os tipos de colágeno mais abundantes são os tipos I, II, III, são os chamados colágenos intersticiais, dentre estes os colágenos tipo I e III são os envolvidos no processo de reparo de tecidos moles. O colágeno tipo III, também denominado fetal ou embrionário corresponde ao principal componente da reação de granulação nas em cicatrização e da camada reticular do tecido conectivo da mucosa oral. Com a progressão da cicatrização, a quantidade de colágeno tipo III diminui e um colágeno mais forte e robusto, o tipo I é depositado (COTRAN *et al.*, 2000).

Em dois a três dias após a lesão, observam-se células ovais com grande atividade mitótica. Em quatro a cinco dias foram encontrados fibroblastos bipolares produzindo fibronectina, colágenos tipo I e II e proteoglicanas. O início de produção de colágenos pelos fibroblastos ocorre após 24 horas da lesão, entretanto a deposição de colágeno nos tecido não é aparente até o quarto dia após a lesão (RUBIN; FABER; 1990).

Inicialmente predomina-se o colágeno tipo III, e após sete a oito dias o colágeno tipo I é predominante. As fibras colágenas são depositadas em paralelo aos fibroblastos e estes estão dispostos em ângulos de 90° em relação aos capilares. Durante a cicatrização, os neutrófilos, macrófagos, células epiteliais e fibroblastos são capazes de produzir collagenase e todos participam da degradação do colágeno tipo III [...]. A maior parte do colágeno tipo III possui um sítio suscetível a proteases inespecíficas. Mesmo após a remoção do colágeno III, a atividade da collagenase permanece elevada no sítio do ferimento por alguns meses. Após os estágios iniciais da cicatrização, a resistência tênsil é estabelecida, os capilares são reabsorvidos e inicia-se a mobilização do tecido. Para tanto é necessário que as fibras e feixes de colágeno sejam re-  
acordo com as novas linhas de força e isso ocorre com a remoção do colágeno inicialmente depositado e pela deposição de novas fibras colágenas [ ... ].

Cotran *et al.* (2000) relatam ainda alguns fatores locais e sistêmicos que interferem nos processos de cicatrização, tais como: deficiência nutricional como carência protéica e de vitamina C que interfere na formação do colágeno. A ocorrência dos Diabetes *Mellitus*, suprimento sanguíneo inadequado, hormônios como os glicocorticóides têm ação antiinflamatória e inibem a produção de colágeno. Localmente

a infecção é a mais importante causa de retardo na cicatrização. Outros fatores podem retardar o reparo como fatores mecânicos, tais como movimentação precoce da ferida, corpos estranhos, tamanho e localização da ferida, onde áreas pouco vascularizadas têm menor poder de regeneração. Shafer *et al.* (1987) mencionam além dos fatores acima, a idade do paciente. Apesar da causa desconhecida, os autores relatam que o tempo de cicatrização é inversamente proporcional à idade do paciente. Também é mencionado o efeito da radiação por raios X, onde a depender da dose pode inibir ou estimular.

### ➤ Laser

A palavra Laser é um acrônimo para *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*, que significa amplificação da luz por emissão estimulada de radiação. Baseado na teoria quântica de Planck, a teoria da emissão de luz estimulada foi apresentada por Einstein, e em 1916, o seu importante trabalho *Zur Quantum Theorie der Strahlung*, proporcionou o desenvolvimento teórico do laser. Mais tarde, Schawlow e Townes elaboraram os princípios pelos quais os Laseres operam. Em 1964, o prêmio Nobel foi concedido para Townes, Basov e Prokholov, creditando-lhes o desenvolvimento da Teoria das Emissões Espontânea e Estimulada de Radiação (PINHEIRO; FRAME, 1991; BRUGNERA JÚNIOR; PINHEIRO, 1998; PINHEIRO, 1998).

O processo de emissão de luz estimulada ocorre quando os átomos ou moléculas recebem estímulo, deslocam-se para níveis energéticos mais elevados de forma transitória, e quando retornam ao seu nível de repouso, emitem o dobro de energia

absorvida em forma de fótons. Então, os átomos já excitados interagem com um novo fóton e liberam para o meio dois fótons induzidos, gerando então a emissão estimulada de energia. A descarga inicial de fótons que pode ser em forma de energia radiante, é absorvida por átomos vizinhos, os quais se tornam excitados e liberam mais energia com o mesmo comprimento de onda. A radiação produzida é então refletida para frente e para trás dentro da cavidade óptica, progressivamente excitando átomos. Esta cavidade óptica varia em tamanho e forma a depender do meio ativo e potência do laser e dentro dela existem dois espelhos posicionados em cada uma das extremidades da câmara, onde um dos espelhos é totalmente reflexivo e o outro parcialmente reflexivo. Esta diferença de níveis de reflexão entre os espelhos permite a saída da radiação de dentro desta cavidade óptica, formando assim o raio laser (PINHEIRO, 1998).

Existem várias classificações para os diversos tipos de lasers utilizados na área médica e variam em seus princípios ativos, potência e conseqüentemente sua indicação. De acordo com o meio ativo, os lasers são divididos em: sólidos, como o laser de Rubi; podem ser líquidos como no caso do laser de corante (Rodamina); os gasosos, dentre eles estão o laser de Ar (Argônio), o laser de CO<sub>2</sub> (dióxido de Carbono), HeNe (Hélio-Neônio), HeCd (Hélio-Cádmio) e GaAs (Arseneto de Gálio). Ainda podem ser mistos como Nd:YAG (Neodímio: Ítrio, Alumínio, Granada), Er:YAG (Érbio:Ítrio, Alumínio e Granada) e Ho:YLF (Hólmio: fluoreto de Ítrio Lítio). Os lasers também podem ser classificados de acordo com as suas propriedades terapêuticas em dois grandes grupos: os lasers não-cirúrgicos e os lasers cirúrgicos. Os lasers cirúrgicos mais utilizados na cavidade bucal são o de CO<sub>2</sub>, Ar, Nd:YAG e Er:YAG . E ainda podemos dividi-los de acordo com seu modo de funcionamento contínuos, pulsáteis e Q-switched (BRUGNERA JÚNIOR; PINHEIRO, 1998; PINHEIRO, 1998).

### ➤ Interações teciduais do laser

A radiação laser é uma forma de radiação não-ionizante altamente concentrada, localizada entre o espectro infravermelho e vermelho, e a interação entre o raio laser e o tecido pode gerar efeitos como biomodulador ou ablativo que dependem do comprimento de onda e a sua afinidade pelo tecido irradiado, bem como da densidade de potência e o tempo de irradiação. Sendo assim, a radiação laser é bem tolerada pelos tecidos e pode ser usada terapêuticamente, sem riscos para o paciente e sem oferecer contra-indicação para pacientes gestantes, nem portadores de marca-passo (PINHEIRO, 1998).

Os fenômenos que envolvem a interação entre os diversos lasers e tecidos baseiam-se principalmente no entendimento das reações que podem ser induzidas nestes tecidos pela luz laser. Cada tipo de meio ativo produz uma luz laser de comprimento de onda específico e cada comprimento de onda reage de uma maneira diferente com cada tecido (PINHEIRO, 1998).

Veremos então os parâmetros físicos do raio laser, que determinam o tipo de ação resultante da interação do laser nos tecidos, que foi bem descrito por Reinisch (1996):

1. A frequência da onda, que significa o total de ondas que passam por um determinado ponto, num intervalo de tempo de um segundo;
2. A potência do aparelho de laser que é a energia liberada por unidade de tempo, medida em Watts (W);

3. A densidade de potência é a energia liberada por segundo e por unidade de superfície, têm sua unidade em  $\text{Watts/cm}^2$  ou  $\text{Joules/s} \times \text{cm}^2$ , como a densidade de energia, porém depende do ponto de impacto de raio e da potência emitida. É importante ressaltar que este parâmetro é determinante nos efeitos biológicos produzidos pelo laser;
4. A densidade de energia corresponde à quantidade de energia necessária para irradiar  $1\text{mm}^3$  de tecido a qual é determinada pela quantidade de energia necessária para aquecer  $1\text{mg}$  de água a  $37^\circ\text{C}$  ao vapor a  $100^\circ\text{C}$ , expressa em  $\text{Joules/cm}^2$  e corresponde à densidade de potência sobre o tempo;
5. O diâmetro do raio corresponde à impressão do raio numa superfície focal; esta pode ser definida como a distância focal, distância entre a lente e o ponto focal.

A absorção da luz laser pelos tecidos pode resultar em quatro processos: fotoquímico, fototérmico, fotomecânico e fotoelétrico e, de acordo com os efeitos clínicos podem ser representados pelas seguintes manifestações: efeito fotoquímico: biomodulação; fototérmico: fotoablação e fotopirólise; efeito fotomecânico: fotodisrupção, fotodissociação e efeitos fotoacústicos; e os efeitos fotoelétricos: fotoplasmólise (BRUGNERA JÚNIOR; PINHEIRO, 1998; PINHEIRO, 1998).

Dentre estes processos citados acima, ressaltamos a fotoablação e a biomodulação, antes chamado de bioestimulação. A fotoablação é uma manifestação térmica dos lasers cirúrgicos e se caracteriza pelo processo de remoção de tecido por sua vaporização e pelo superaquecimento dos fluidos tissulares, ocasionando coagulação e hemostasia. Enquanto que, a biomodulação é decorrente do efeito



fotoquímico dos lasers não-ablativos, e corresponde ao efeito da irradiação da luz laser sobre os processos celulares, moleculares e bioquímicos que normalmente ocorrem nos tecidos [ ... ].

A fotomodulação proporcionada pelo laser já foi descrita por inúmeros estudos, através de várias metodologias, e hoje é considerado por pesquisadores do mundo todo um benefício do laser no reparo de feridas limpas. Porém, o efeito biomodulador depende do estado fisiológico da célula ou do tecido no momento da exposição. Então é possível que a terapia a laser tenha pouco ou nenhum efeito óptico sobre condições fisiológicas normais. O mecanismo pelo qual ocorre fotoestimulação celular e conseqüentemente produção de colágeno ainda é discutida, porém, a teoria mais aceita é a de que seriam as mitocôndrias os fotoreceptores de energia de luz, acarretando no aumento na produção de energia e conseqüente aumento do metabolismo celular (YU *et al.*, 1997).

A absorção de energia pela cadeia respiratória causa oxiredução de NADH, produzindo mudanças no estado de redox tanto na mitocôndria quanto no citoplasma. A ativação da cadeia de transporte de elétrons resulta num aumento do potencial elétrico através da membrana da mitocôndria, levando ao aumento no *pool* de ATP e finalmente a ativação da síntese de ácido nucléico. O efeito de bioestimulação eleva os níveis de fatores de crescimento, dentre eles o FGF $\beta$ , levando ao aumento do número de fibroblastos e conseqüentemente maior formação de MEC [...]

Desde a década de 80 que estudos vem comprovando a indução do aumento da quantidade de ATP, com irradiação de comprimento de onda de 632nm, em mitocôndrias isoladas. Karú *et al.* (1995), em um estudo com cultura de células, evidenciaram que o índice de ATP celular não muda durante os primeiros 15 minutos após a irradiação. Este aumento ocorre significativamente somente 20 minutos após a irradiação. Depois um período de 18 horas após a irradiação das células com luz de  $\lambda$ 632nm, a atividade das enzimas mitocôndriais NADH dehidrogenase e citocromo oxidase estiveram muito aumentadas quando comparado com células-controle, sendo respectivamente de 241% e 128%, com relação a 100% do grupo controle.

As Investigações com microscopia eletrônica realizada por Karú *et al.* (1995) demonstraram mudanças nas mitocôndrias isoladas e linfócitos humanos depois da irradiação com luz vermelha de  $\lambda$ 632nm. A formação das mitocôndrias “gigantes” fornece um nível mais elevado do *turnover* de respiração e de energia celulares. Irradiação com laser de HeNe resulta no incremento de RNA mitocondrial e síntese de proteínas. Isto pode ser atribuído a uma significativa modificação na estrutura mitocondrial que proporciona mudanças também na atividade enzimática. Usualmente a mudança de energia de células em culturas indica que mais de 80% das moléculas de adenina de nucleotídeos podem se tornar ATP. Assim, o incremento no nível de ATP celular induzido por luz de  $\lambda$ 632nm se deve a síntese de novas moléculas de adenina de nucleotídeos e a fosforilação da ADP e adenosina monofosfato (AMP). A síntese de novas moléculas de adenina nucleotídeo pode explicar o aumento na concentração de ATP celular. Estas possibilidades podem ser verificadas com a mensuração de níveis de ADP e AMP.

Os pesquisadores Al-Watban e Zhang em 2001 avaliaram o efeito de vários tipos de lasers não ablativos, dentre eles o laser de HeNe, Ar, Criptônio e GaAIs, no processo de cicatrização onde os melhores resultados foram apresentados pelo laser de HeNe, com  $\lambda 632,8\text{nm}$ , com dose de  $20\text{J}/\text{cm}^2$ . Com relação à penetrabilidade dos lasers nos tecidos biológicos, concluem, que esta capacidade de transmissão é diretamente proporcional ao comprimento de onda do laser e a maior transmissão na pele foi apresentada pelo laser de GaAIs.

➤ **Laser de CO<sub>2</sub>**

O laser de dióxido de Carbono (CO<sub>2</sub>) desenvolvido por Patel no início dos anos 60, emite comprimento de onda de  $10.600\text{nm}$  ( $\lambda=10,600\text{nm}$ ), estando na faixa infravermelha do espectro (BRUGNERA JÚNIOR; PINHEIRO, 1998).

Entre os lasers ablativos, o laser de dióxido de Carbono é o mais indicado para cirurgia de tecidos moles. Este laser tem como meio ativo o dióxido de Carbono misturado a Nitrogênio e Hélio; possui comprimento de onda de  $10,600\text{nm}$  e emite radiação no espectro infravermelho (invisível ao olho humano) (BRUGNERA JÚNIOR; PINHEIRO, 1998; PINHEIRO, 1998; FREITAS, 2000; FREITAS, 1998; FRAME, 1984; PINHEIRO *et al.*, 1997). O laser de dióxido de Carbono é fortemente absorvido na superfície do tecido, derme e sobretudo mucosa bucal, devido a grande afinidade que o seu comprimento de onda apresenta pelos fluidos tissulares. A depender do coeficiente de absorção do tecido irradiado, o laser cirúrgico, ao incidir pode levar a vaporização, carbonização, coagulação ou unicamente desnaturação protéica (FRAME, 1984;

BRUGNERA JÚNIOR; PINHEIRO, 1998; PINHEIRO, 1998). Quando a energia é intensamente absorvida pelo tecido, ocorre vaporização intra e extracelular, com ruptura da membrana celular, resultando numa ferida que cicatrizará por segunda intenção (FRAME, 1984).

Em especial o aparelho de laser de CO<sub>2</sub> modelo Sharplan 20C®, possui dois sistemas operacionais, baseados em dois controles distintos, que podem ser combinados entre si resultando em nove combinações possíveis de padrões de funcionamento, permitindo ampla aplicabilidade clínica. Estes controles são: o modo operacional de produção do laser e o modo operacional de exposição. O modo operacional de produção controla o padrão e o pico de potência produzida, e pode ser contínuo, CW (ondas contínuas) que emite luz laser contínua; superpulso (RSP) e o pulsado que oferecem uma seqüência de luz laser em pulsos de tamanhos variáveis. Já o modo operacional de exposição, controla a duração da emissão do laser sobre os tecidos e pode ser CW, pulso simples ou pulso repetido. Modo operacional de exposição do laser: contínuo, é emitido num período de tempo sem ser interrompido; o pulso simples; emitido como um pulso único e curto e o pulso repetido, emitido intermitentemente como uma série de pulsos, sejam estes emitidos de forma contínua, pulsado ou superpulso. Este aparelho de CO<sub>2</sub> possui diâmetro do spot de 1000 $\mu$  ou 1mm, freqüência de 10Hz, pulso que variam de 10milli-segundos (100 m seg) à 1s e tem poder de penetração nos tecidos biológicos em torno de 30 $\mu$ m (micrômetros) (SHARPLAN, 1995).

Dentre as vantagens do laser de CO<sub>2</sub> está a eliminação precisa de tecido, com excelente hemostasia, resultante do vedamento de pequenos vasos, sanguíneos e linfáticos e conseqüentemente uma boa visualização do campo operatório. Este efeito também oferece a diminuição dos riscos de disseminação de células tumorais pelos vasos locais, já que estes se obliteram com a ação térmica do laser o que leva também à redução do edema e conseqüentemente diminuição da dor pós-operatória. Também por conta desta elevação de temperatura na área irradiada, é possível se conseguir uma esterilização imediata da ferida no momento da irradiação. Ainda como vantagens, este recurso também oferece menor contração da ferida e conseqüentemente pouca formação de cicatriz, além de dispensar a sutura (MEDRADO *et al.*, 2003; BRUGNERA JÚNIOR; PINHEIRO, 1998; PINHEIRO, 1998; FREITAS, 2000; SINHA; GALLAGHER, 2003). Pesquisadores vêm mostrando as vantagens do uso do laser de CO<sub>2</sub> nas cirurgias bucais, sobretudo em tecido mole, tendo em vista todos os benefícios que o torna importante recurso como alternativa às cirurgias convencionais (MEDRADO *et al.*, 2003; FREITAS, 2000; FREITAS, 1998; FRAME, 1998; PINHEIRO *et al.*, 1997).

Pinheiro (1993) utilizou o laser CO<sub>2</sub> em excisões em dorso da língua de rato para verificar o efeito do aumento de temperatura nos tecidos. Através de técnica de histoquímica, foram observadas três zonas formadas após a irradiação pelo laser de CO<sub>2</sub>, classificadas como: a) zona de vaporização, onde ocorre a retirada tecidual através da ação do laser; b) zona de carbonização, área mais próxima da cavidade, responsável pela coloração escura; c) zona de vacuolização, que é imediatamente vizinha à carbonização, se assemelhando a uma esponja, pois há formação de vapores durante a irradiação. Sabendo-se que o calor se difunde através de algumas camadas abaixo do

tecido irradiado, chegando a altas as temperaturas no tecido com a aplicação do laser  $\text{CO}_2$ , é de se esperar que ocorra um envolvimento de células onde não houve o contato direto com o raio. A temperatura que se considera suficiente para que ocorra a desnaturação protéica é de  $60^\circ\text{C}$ ; assim, os tecidos que atingem esta temperatura, mesmo que por uma fração de segundos são considerados como danificados permanentemente (BRUGNERA JÚNIOR, 1999). A Figura 1 representa as alterações teciduais causadas pelo aumento de temperatura com a irradiação com o laser de  $\text{CO}_2$ .

Fulton e Shitabata (1999) elaboraram um novo modelo físico de interação do laser de  $\text{CO}_2$  ultrapulso e a pele. Convencionalmente descreve-se o modelo físico da forma de cone dos efeitos do laser de  $\text{CO}_2$  demonstrando a zona de vaporização, zona de necrose e zona de dano térmico. Os autores observaram clinicamente que este dano foi extensivo para fora da área de incidência do feixe de luz laser, havendo assim uma lateralização dos efeitos do laser no tecido vizinho do plano da pele.

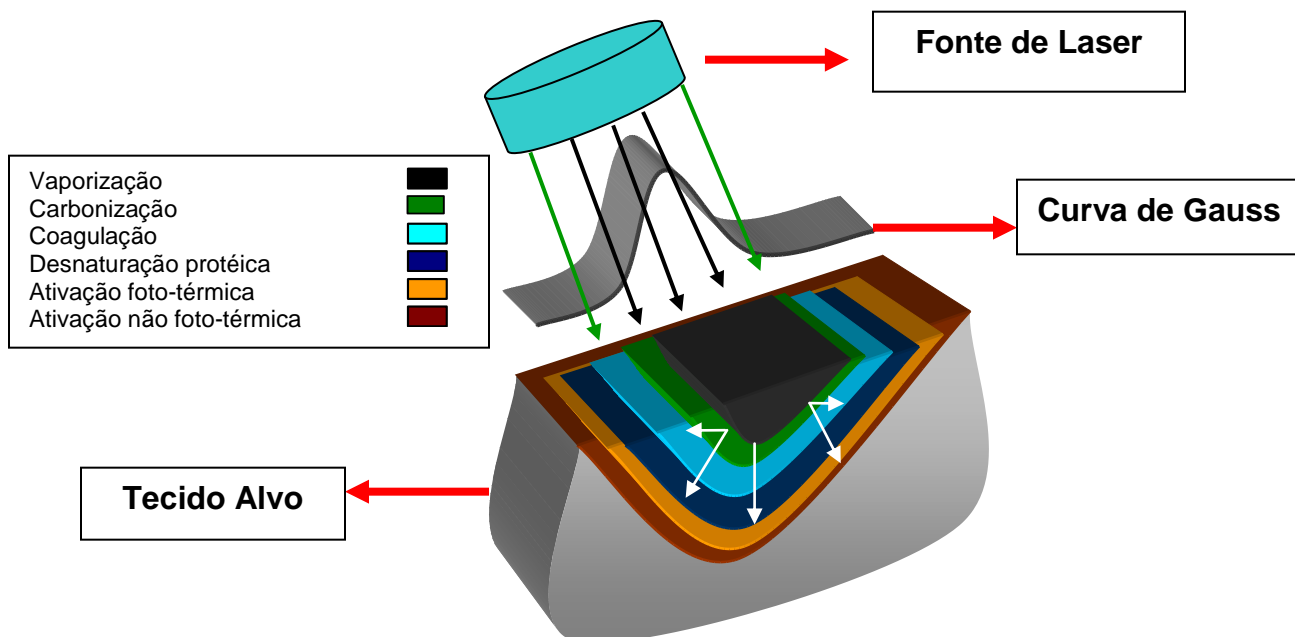


Figura 1 – Perfil especial Gaussiano de um feixe de laser e sua interação com o tecido (FONTE: Freitas 2000)

➤ **Estudos realizados com laser de CO<sub>2</sub>**

O tecido tratado com o laser ablativo de CO<sub>2</sub> não é “queimado”, mas quase sempre ocorre uma vaporização instantânea do fluido intracelular, causando uma desintegração da estrutura celular e simultaneamente a desnaturação protéica próxima à ferida cirúrgica, o que leva a uma cicatrização por segunda intenção. Em consequência a este processo, forma-se uma camada de colágeno desnaturado na superfície das feridas a laser, que, provavelmente, atua como “cimento biológico”, imediatamente após a cirurgia, reduzindo o grau de irritação local provocada pelos componentes bucais, amenizando, conseqüentemente, a dor e o desconforto pós-operatório (FISHER *et al.*, 1983 *Apud* RALDI, NICCOLI-FILHO, PRAKKI, 1999).

A resposta inflamatória é uma característica que diferencia a cicatrização de feridas realizadas com laser das feridas convencionais. Nas feridas realizadas com laser, a fase inflamatória da cicatrização apesar de ser mais intensa, é mais breve que as feridas convencionais, o que ajuda no processo de reparo, pois ambas terão o tempo total de cicatrização semelhantes (PINHEIRO, 1993). Existem também, evidências clínicas, de que o processo inflamatório é atenuado quando a laserterapia é associada à cirurgia a laser (FREITAS, 1998).

Quando comparada à resposta inflamatória ocorrida entre as feridas realizadas com eletrocautério, laser de CO<sub>2</sub> e bisturi, Johnson *et al.* (1997) observaram na ferida realizada com laser de CO<sub>2</sub> uma resposta inflamatória inicial mais intensa e que se perdura por mais tempo que as outras duas. Isto se deve ao fato de haver mais

destruição tecidual na técnica do laser, com relação às outras duas técnicas. Porém, em 1993, Pinheiro verificou que o resfriamento prévio do tecido a ser irradiado com laser de CO<sub>2</sub> proporciona um menor dano tecidual e que estas feridas apresentam um reparo com menor formação de cicatriz e em um período semelhante às aquelas realizadas com bisturi.

No trabalho realizado por Watanabe *et al.*, (1987) observou-se imediatamente após a incisão da mucosa de rato pelo laser de CO<sub>2</sub> a formação de cratera com material necrótico ao longo das paredes. Quando a luz laser é absorvida pelo tecido, a energia luminosa é transformada em calor e a temperatura na área de impacto aumenta rapidamente até 100°C, ocasionando ebulição dos líquidos intra e extra-celulares e vaporização dos componentes teciduais, formando-se assim uma camada necrótica do tipo coagulativa. Após três dias da incisão, a cavidade apresentou-se preenchida por material fibrinoso com delicados feixes de fibras colágenas em proliferação e poucos neutrófilos polimorfonucleares. Ao Quinto dia de pós-operatório já foi percebido tecido epitelial recobrando a cavidade a qual encontra-se preenchida por material bem organizado, com grande quantidade de fibroblastos e feixes compactos de fibras colágenas, além de neovascularização, linfócitos e plasmócitos. Após sete dias a ferida apresentou-se completamente cicatrizada.

Um estudo verificou os efeitos dos lasers de CO<sub>2</sub> e Er: YAG isolados e combinados, com o intuito de identificar uma combinação ideal de lasers, com a finalidade de explorar os efeitos teciduais mais favoráveis de cada laser. Utley *et al.* (1999) trataram 10 pacientes em quatro pontos preauriculares, antes da ritidectomia foram observados achados como necrose térmica, grau de reepitelização, espessura das



camadas da pele, dano ao colágeno e nova formação de colágeno. Após sete dias, a reepitelização e a formação de colágeno foi semelhante em todos os grupos, mas a associação do CO<sub>2</sub> e Er: YAG e o Er: YAG isolado mostraram menos necrose térmica, menor injúria ao colágeno e as camadas da epiderme. Embora o laser de CO<sub>2</sub> possa oferecer eritema persistente, mostra também a vantagem de menor contração da pele e melhor cicatriz.

No estudo realizado por Raldi *et al.* (1999) em mucosa geniana de cães, se comparou a ferida produzida com bisturi convencional e feridas com laser de CO<sub>2</sub> em duas potências diferentes (10W e 20W); depois de observada pela microscopia de luz, através das colorações de Hematoxilina e Eosina e *Van Gieson* concluiu-se que o dano térmico aos tecidos adjacentes é mínimo e que não há diferença significativa entre as duas potências utilizadas. A proliferação epitelial nas feridas estudadas torna-se evidente a partir do quarto dia de pós-operatório, e se completa ao vigésimo oitavo dia, nas feridas realizadas a laser e ao décimo quarto dia nas feridas com bisturi.

O dano térmico causado pelo laser de dióxido de Carbono é conhecido e relatado por inúmeros experimentos, dentre eles o de Sanders e Reinisch (2000). Estes autores compararam os danos térmicos causados por laser de dióxido de Carbono usado no modo pulsado e contínuo. O laser de CO<sub>2</sub> modelo Sharplan® foi usado com potência de 5W, em CW e 0,2 segundos de duração do pulso e freqüência de 1Hz e o laser de CO<sub>2</sub> (TEA CO<sub>2</sub> da Argus Photonic group) em três níveis de repetições: de 5HZ, 10Hz e 15Hz, emitindo de 30 – 60mJ de pulso de energia. Os pesquisadores observaram que a injúria térmica imediata à incisão causada pelo modo contínuo foi a maior de todas. A

profundidade média de dano térmico obtida pelo laser de modo contínuo foi praticamente o dobro daquela encontrada com a frequência de 15Hz e a menor profundidade de dano térmico foi obtida com o laser de CO<sub>2</sub> de modo pulsado na frequência de 5Hz. Não houve diferença estatística significativa entre as frequências de 5 e 10Hz e entre 10 e 15 Hz. Os resultados também mostraram que o modo pulsado retarda a cicatrização histologicamente em até 1,9 dia enquanto que o modo contínuo atrasa em até seis dias. Quanto aos testes de tensiometria, as cicatrizes de feridas produzidas com o laser de CO<sub>2</sub> no modo pulsado foram praticamente tão fortes quanto as realizadas com bisturi.

Ainda no estudo de Sanders e Reinisch (2000), histologicamente as maiores diferenças ocorreram nos menores tempos. A epitelização ocorreu no terceiro dia em 100% dos reparos convencionais, 72% com laser pulsado e com laser contínuo não houve a epitelização completa. O dano térmico residual com o laser contínuo foi o mais alto, apresentando grande quantidade de colágeno destruído pela temperatura elevada no local e maior resposta inflamatória aguda e seguido de maior formação de tecido de granulação, significando que houve maior área danificada a ser reparada. No sétimo dia o dano térmico já era menor e a epitelização e a reepitelização só não eram completas em 50% das amostras das incisões com o laser contínuo. Ao 14º dia as incisões com laser pulsado e bisturi mostraram-se mais maduras, já com retorno à morfologia normal. No vigésimo primeiro dia o laser contínuo apresentava ainda maior quantidade de tecido de granulação e menor maturação do colágeno com relação ao grupo controle. Este estudo conclui que um dos parâmetros chave para a utilização do laser de CO<sub>2</sub> tem sido

a duração do pulso do laser e que mesmo sendo menor que o tempo de descanso térmico do tecido, ainda assim é percebida a injúria causada pelo aquecimento do tecido.

Fulton; Shitabata (1999) também observaram a extrema importância do tamanho do pulso no momento de amenizar os danos térmicos causados pelo laser de dióxido de Carbono. Realizaram múltiplas biópsias durante a remoção de lesões da pele com o intuito de criar um novo modelo físico de interação do laser de CO<sub>2</sub> ultrapulso e a pele. As lesões foram tratadas com peças de mão colimadoras em mJ calibradas em quantidade de energias de 100 à 500mJ. A vaporização das lesões com o laser foi realizada com irrigação e a biópsia foi feita após para a realizar a correlação clínico-histológica. Foi observado clinicamente que a ação térmica foi estendida lateralmente à área de incidência do raio laser, percebendo efeitos térmicos nos tecidos próximos ao plano da pele. Também foi percebido que na faixa de energia de 100 à 250mJ os espécimes mostraram largas áreas de colágeno homogeneizado devido ao aquecimento. O melhor índice terapêutico e menor dano térmico foi registrado com a energia de 350mJ. De 450mJ a 500mJ, a zona de vaporização foi mais extensa, produzindo vacúolos na derme com presença de zona basofílica, dano do colágeno e notável extensão do dano lateral.

Payne *et al.*, (1998) compararam clinicamente parâmetros relevantes para a eficiência da ablação, limiar de ablação e injúria térmica da irradiação do laser pulsado de CO<sub>2</sub> com comprimento de onda de 10,6 $\mu$ m e 9,5 $\mu$ m. Constataram que a espessura da zona superficial de injúria térmica foi superior nas incisões realizadas com o laser no

comprimento de onda de 10,6 $\mu$ m, embora o mecanismo de ablação tenha sido o mesmo para ambos os comprimentos de onda.

Em estudos realizados por Luomanen e Virtanen (1987); Luomanen *et al.* (1987); Luomanen e Virtanen (1991), utilizando feridas feitas com bisturi e com laser, os resultados mostram um pequeno número de vasos sanguíneos ao redor das feridas feitas com o laser em comparação as feridas feitas com o bisturi convencional até seis horas após a cirurgia, ressaltando a ação hemostática do laser. Observou-se também que o número de vasos sanguíneos em ambos os casos aumentam na fase inicial do processo de cicatrização e posteriormente retornam a um número dentro dos padrões de normalidade. Os resultados mostraram que a resposta inflamatória foi observada seis horas após a cirurgia em ambos os grupos, e que feridas feitas com o laser de CO<sub>2</sub> cicatrizam mais lentamente e com menor contração que as convencionais, parecendo com a cicatrização por primeira intenção. Estes resultados se confirmam em estudos mais recentes (PINHEIRO, 1993; EDVARD *et al.*, 1996).

Embora as feridas feitas com o laser cicatrizem mais lentamente que as feitas com o bisturi convencional, sabe-se que ao final do processo de cicatrização as feridas feitas com o laser apresentam algumas características que as diferenciam de outras, como por exemplo, as feridas com laser de CO<sub>2</sub> progridem com diminuição ou ausência de contração quando comparadas com as feitas com bisturi convencional. Isto poderia ser decorrente da pequena quantidade de miofibroblastos na região da feridas, como sugeriram inicialmente Fisher *et al.* (1983) e posteriormente comprovado por Pinheiro (1993); Edvard *et al.* (1996) e Freitas (2000).

Resultados semelhantes foram encontrados por Loumanen *et al.* (1988), através de microscopia eletrônica e de fluorescência, foram avaliadas feridas realizadas em língua, mucosa e pele do dorso de ratos e analisadas nos tempos imediatamente após a incisão, dois, quatro, sete, onze e vinte e oito dias após a cirurgia. Para tanto, utilizou-se bisturi e laser de CO<sub>2</sub> na potência de 10W, focado, com 0,5mm de diâmetro. Houve pequena quantidade de miofibroblastos nas feridas realizadas com Laser, e observou-se que estas células se faziam mais presentes nas feridas da língua e da pele. Com estes resultados, os autores sugerem que a falta de contração da ferida está relacionada com a ausência de organização dos miofibroblastos, sendo as feridas realizadas com o bisturi como controle.

Outros estudos reafirmaram estes resultados, como Chomette *et al.* (1991) que, através de biópsias sucessivas, em quatro pacientes nos tempos de duas, vinte e quatro horas e quatro dias, verificaram nas feridas a laser, numerosos fibroblastos, porém, no tecido subepitelial não havia miofibroblastos e poucos fibroblastos. Os autores sugerem que a menor velocidade de reparo destas feridas realizadas com o laser de CO<sub>2</sub> pode estar relacionada à ausência de miofibroblastos durante este processo. Também, se encontrou nas feridas a laser, fibroblastos com características ultra-estruturais diferentes daqueles encontrados nas feridas feitas com bisturi. Isto pode ser decorrente do efeito bioestimulador do laser, levando a maior síntese de colágeno e conseqüentemente uma boa qualidade da cicatrização de feridas com o laser de CO<sub>2</sub>.

Howard *et al.* (1997) utilizaram o laser de CO<sub>2</sub>, em modo contínuo, numa potência de 5W, selecionada com base em estudos preliminares, os quais indicam que, o dano térmico é diretamente proporcional à potência, mas que potências menores necessitavam de um maior tempo de exposição para criar incisões com a profundidade desejada. Eles utilizaram neste estudo um sistema chamado “CAST” que corresponde a um microposicionador acoplado a um computador e um software específico que padronizava incisões descontínuas, num intervalo de tempo de 0,5 seg e a uma distância pré-programada para um novo corte. A estes intervalos de ablações os autores chamaram de passos. O intuito deste estudo foi avaliar se o intervalo entre os pontos de ablação (passos) amenizaria os danos térmicos. Para tanto foi observado o perfil térmico, o nível de contração e o padrão histológico de reparo de seis tipos de incisões: incisão realizada com bisturi, laser de CO<sub>2</sub> controlado manualmente, laser de CO<sub>2</sub> controlado pelo *software* de forma contínua, com passos duas, três, e seis vezes o tamanho do *spot*.

Os resultados encontrados por Howard *et al.* (1997) mostraram que a incisão contínua teve um maior aumento de temperatura no tecido adjacente, seguida das incisões de dois, três e seis passos respectivamente. Isto quer dizer que quanto maior o intervalo entre os pontos ablaçados, menor o dano térmico. Com relação à tensão das cicatrizes, não houve diferença estatisticamente significativa, quando comparadas as diferentes formas de incisões a laser. Para análise histológica, foram tomados os seguintes critérios: epitelização da ferida, formação de crosta, área de tecido de granulação e inflamação, utilizando a técnica de Hematoxilina e Eosina e Tricrômico de Masson. As observações histológicas do grupo da incisão em modo contínuo

apresentaram pior padrão de cicatrização. Das incisões pontilhadas, as tiveram os melhores resultados foram aquelas com maior distância entre os pontos ablacionados. Os autores concluíram que as incisões com laser tiveram um retardo na cicatrização, atribuído ao dano térmico causado aos tecidos vizinhos e a análise histológica confirma a atenuação destes danos térmicos utilizando o sistema CAST.

Um estudo realizado por Romanos *et al.* em 1999 apresentou características histológicas e clínicas da cicatrização de feridas em tecidos moles bucais de macacos produzidos com o laser de CO<sub>2</sub>. Para tanto, os autores realizaram incisões entre 10 a 15mm de extensão no palato do animal com lâminas de bisturi e incisões com laser de CO<sub>2</sub> usando potências de 2W, de 4W e de 6W. Os sacrifícios foram realizados nos tempos de três, sete e 14 dias e observadas as alterações teciduais utilizando as técnicas de tricrômico de Masson e ácido periódico de Schiff.

Os achados histopatológicos mostraram que ao terceiro dia a injúria térmica estava diretamente relacionada com a potência utilizada, apresentando pouca evidência de reparo, fragmentação e desorientação de fibras colágenas no tecido conjuntivo e solução de continuidade substituída por exudato fibrino-purulento de espessura variável no tecido epitelial, bem como infiltrado inflamatório agudo e crônico difuso e de várias intensidades. As feridas realizadas com bisturi estavam totalmente epitelizadas com evidência de atividade fibroblástica e escasso infiltrado inflamatório mononuclear (crônico). Após sete dias da incisão, as feridas a laser e bisturi apresentavam-se epitelizadas e o tecido conjuntivo das feridas a laser apresentava-se com poucas e imaturas fibras colágenas e infiltrado inflamatório brando mononuclear. O grau de dano

térmico relacionado à potência consistiu na formação de vacúolos no tecido subepitelial adjacente. As interdigitações do tecido epitelial no tecido conjuntivo foram notadas apenas nas feridas realizadas com a potência mais baixa e nas feridas com bisturi convencional. Com duas semanas, todas as incisões tiveram reparação completa. Para os autores, os achados evidenciaram que a extensão do dano térmico é governada pelo comprimento de onda do laser, a potência, o modo de entrega do raio, a duração do pulso, a frequência do pulso e o tempo de exposição. Apesar das incisões com bisturi não causarem dano térmico, estas permitem extravasamento de sangue e linfa, resultando numa reação inflamatória mais marcante com maior formação de crosta, comparado com as incisões a laser. Inicialmente, as feridas a laser se mostraram mais frágeis e seu retardo na epitelização pode ser atribuídos a substâncias inibitórias produzidas pelo tecido necrótico, barreira física causada pela presença de crosta, bem como a fusão das células epiteliais adjacentes causadas pelo calor. Entretanto, este estudo associou uma maior quantidade de células inflamatórias agudas em incisões realizadas com laser. Os autores concluíram que as mudanças térmicas e conseqüente aumento da inflamação e impedimento da organização tecido só são marcantes nos primeiros dias do reparo [...].

Raldi *et al.*(1999) também observaram em seu estudo clínico a importância da potência em cirurgias a laser. Os autores utilizaram o laser de CO<sub>2</sub> em potências de 5W, 10W, 15W e 20W. Já ao terceiro dia, os grupos irradiados com as potências de 5 e 10W apresentaram-se sem exsudato e discreto edema e hiperemia. Ao sétimo dia, no grupo irradiado com potência de 5W, as feridas encontravam-se completamente fechadas. Os autores concluíram que a reparação das incisões realizadas em ratos com laser de CO<sub>2</sub>



nas potências de 5 e 10W são clinicamente semelhantes às realizadas por bisturi convencional.

Cornelissen *et al.* (2000) realizaram um trabalho produzindo feridas em palato de ratos, observadas num período de sessenta dias, e avaliando colágeno e miofibroblastos através da imunocitoquímica. Nos resultados obtidos foi observado reepitelização antes mesmo do aparecimento de miofibroblastos. A marcação para alfa actina só apareceu após o quarto dia de pós-operatório e aumentou só até o oitavo dia, quando a reepitelização estava completa e sua maior concentração ocorreu ao nível do periósteo, submucosa e lâmina própria.

Patrocínio e Niccoli-Filho (2000) avaliaram os efeitos do laser de dióxido de Carbono em mucosa de ratos com várias potências. Dentre seus achados, a menor potência ofereceu o melhor resultado no que diz respeito ao dano térmico tecidual e conseqüentemente melhor qualidade de reparo. Com a potência de 2W, o início de epitelização ocorreu no terceiro dia, o que com as outras potências isto só foi percebido mais tardiamente. Os autores ainda sugerem que, a demora no reparo de feridas irradiadas com o CO<sub>2</sub>, deve-se a menor migração de células para área comprometida, diminuição ou ausência de miofibroblastos, o que oferece também menor contração; fato destas feridas apresentarem retardo na epitelização. Além disso, mencionaram a demora da reabsorção do tecido carbonizado, diminuindo assim a atividade fibroblástica e formação do tecido de granulação.

Também utilizando a técnica de imunohistoquímica, através dos anticorpos: anti-Dismina, anti-Vimentina e anti-Actina, Edvard *et al.* (1996) avaliaram o efeito do laser de CO<sub>2</sub>, com 5W de potência por cinco segundos, produzindo uma ferida cirúrgica em dorso de língua de ratos, medindo 4x3mm. De acordo com os tempos de observação imediatamente após a cirurgia, dois, quatro, oito, 10 e 30 dias de pós-operatório e através da microscopia eletrônica de varredura, os autores não observaram retardo na cicatrização e sim uma completa re-epitelização ao décimo dia. Os miofibroblastos foram evidentes após o segundo dia de pós-operatório e persistindo até o trigésimo dia, com marcação positiva para os três anticorpos utilizados no estudo.

Em 2000, Freitas realizou um estudo imunohistoquímico, para evidenciar miofibroblastos, com o intuito de quantificá-los nos processos de reparo de feridas feitas com laser de CO<sub>2</sub> e com bisturi convencional. Observou maior presença destas células nos tempos cirúrgicos experimentais de oito e quatorze dias, porém no tempo menor, o número de miofibroblastos foi estatisticamente maior, nas duas técnicas. Este fato indica que, nos tempos mais precoces do reparo, existe uma maior contração das feridas excisionais para que haja aproximação das bordas da feridas. Também foi possível constatar que no oitavo dia, as feridas realizadas com o laser possuíam estatisticamente menos miofibroblastos que a ferida convencional, porém, no tempo de 14 dias, não houve diferença estatística do número de miofibroblastos.

Zeinoun *et al.* ,em 2001, verificaram que a quantidade de miofibroblastos foi três vezes maior nas feridas realizadas com bisturi com um pico máximo no terceiro dia, quando comparadas às realizadas com CO<sub>2</sub>, na potência de 5W, que possuiu pico

máximo de número de fibroblastos no quarto dia. Os autores demonstraram ainda que em momentos precoces do processo de cicatrização, quando há tecido de granulação jovem, os fibroblastos se expressam pobremente pela Vimentina, porém a medida que a cicatrização avança, estas células também são expressas pela  $\alpha$ -Actina, mesmo que temporariamente. O uso destes dois anticorpos serviu para diferenciar os miofibroblastos envolvidos com a contração de feridas dos outros fenótipos.

### ➤ **Efeito da Laserterapia no Processo de Cicatrização**

O laser não-cirúrgico foi introduzido na área médica há aproximadamente 30 anos. Os aparelhos utilizados atualmente estão disponíveis em ambas as formas de emissão, contínua ou pulsátil, e operam em comprimentos de onda no espectro visível ou invisível. Ao contrário do laser cirúrgico que opera com potência de mW (miliwatts) a centenas de W (Watts), provocando ablação tecidual, o laser não-cirúrgico tem sua potência variando entre 1-100mW, o que não provoca alterações de temperatura nos tecidos (BRUGNERA JÚNIOR; PINHEIRO, 1998; PINHEIRO, 1998).

A energia laser em baixa potência entregue aos tecidos, quando absorvida, levam a duas maneiras de atuação: através da ação química, na estimulação da liberação de Histaminas, Serotonina, Bradicinina e Heparina e através da modificação das reações enzimáticas, tanto no sentido de estimulação, quanto no sentido de inibição (BRUGNERA JÚNIOR *et al.*, 1991). Existem hoje basicamente três tipos de laser não-cirúrgico utilizados em Odontologia: o laser de Hélio-Neônio (HeNe), o de Arseneto de Gálio infravermelho (GaAs) e o de Arseneto de Gálio e Alumínio (GaAlAs) [...]

O mecanismo biomolecular de interação do laser, mencionado primeiramente por Karú (1987), consiste em efeito foto-físico ou foto-elétrico e estes efeitos provocam modificações nos potenciais de membrana. Em decorrência dos efeitos bioelétricos, a radiação laser provoca um aumento de íons de sódio e diminuição de íons potássio na região extracelular, e inversamente a nível intracelular, levando a incrementos de ATP mitocondrial e favorecendo reações que interferem no metabolismo celular. Com a maquinaria celular em atividade aumentada, ocorre maior síntese de DNA e RNA; incremento na formação de colágeno e precursores; aumento do nível de  $\beta$ -Endorfina no líquido cefalorraquidiano, peptídeo responsável pelo efeito analgésico usado nos tratamentos de algias do Trigêmio; variação quantitativa de prostaglandinas, oferecendo efeito antiinflamatório; modulação na síntese de proteínas, na revascularização, na proliferação e diferenciação celular. Em estados fisiológicos alterados, o laser interfere no processo de troca iônica, acelerando o incremento de ATP (BRUGNERA JÚNIOR *et al.*, 1991; PINHEIRO, 1998; KARÚ, 1987).

Parâmetros ópticos da pele são importantes para a terapia com luz laser. Kolárová *et al.* (1999) analisaram, num estudo *in vitro*, a penetração da luz laser e testou propriedades ópticas diferentes em espécimes de fragmentos de 2cm<sup>2</sup> de pele humana normal e pele ulcerada com tecido de granulação. Para tanto foi utilizado o HeNe, com  $\lambda$ 632,8nm, e potência de 50mW e com comprimento de onda de 675nm com potência de 21mW. Os resultados deste estudo mostraram que a irradiação óptica na pele humana depende de diferentes fatores individuais de cada pele. Em uma espessura de derme e

epiderme de 4,1mm de espessura, tem uma penetração de 4,8% com comprimento de onda de  $\lambda 632,8\text{nm}$  enquanto que em 0,035mm de epiderme a penetração deste comprimento de onda é de 68%. Em epiderme abdominal com esta mesma espessura a penetração deste comprimento de onda chega a 80,5% e cai para 0,3% em fragmentos de pele com 19mm, incluindo epiderme, derme e subcutâneo adiposo. Os dados do estudo indicam que este comprimento de onda na faixa vermelha, do espectro visível tem sua penetração praticamente na superfície da epiderme e que comprimento de onda maiores, como o  $\lambda 675\text{nm}$  também avaliado no estudo, possui valores de penetrações maiores, nas mesmas condições quando comparado com o  $\lambda 632,8\text{nm}$ . Em geral, parte da luz é refletida após atingir a pele e parte da luz penetra na profundidade do tecido onde é dispersa ou absorvida de acordo com as propriedades ópticas do tecido.

A bioestimulação é de natureza fotobiológica e envolve a cadeia respiratória mitocondrial, induzindo mudanças nos níveis do AMPc (Adenosina monofosfato cíclica) que é um nucleotídeo cíclico que possui função regulatória em diversos processos metabólicos, sendo estes componentes os chamados fotoreceptores primários (KARU, 1987).

Diversos autores observaram incremento na vitalidade funcional das mitocôndrias, capacidade maior de regeneração e cicatrização dos tecidos e ação não degenerativa provocada pela luz laser HeNe nos tecidos irradiados (GENOVESE, BRUGNERA JÚNIOR e VILLA, 1992).

Benedicenti publicou uma série de trabalhos sobre a ação da luz laser na biomodulação tecidual. Ele verificou que um aumento do ATP mitocondrial estimulado

pelo laser não tem capacidade de produzir células neoplásicas, porém produz um efeito analgésico, comprovado através do método radioimunológico, onde constatou um aumento de  $\beta$ -Endorfina no líquido cefalorraquidiano e  $\beta$ -Endorfina endógena, peptídeo responsável pelo efeito analgésico do laser (GENOVESE *et al.*, 1992). O seu efeito antiinflamatório foi demonstrado pela influência na mudança de caráter metabólico, energéticos e funcionais, que favorecem o aumento da resistência e vitalidade celular, levando-as à sua normalidade funcional com rapidez. Alguns autores afirmaram que há uma transformação das prostaglandinas em prostaciclina e ativação da respiração celular evitando-se acidose e alteração distrófica secundária do tecido. O efeito na cicatrização foi observado como a grande capacidade de regeneração que a luz laser provoca em células de várias origens. É relatado um aumento dos fatores humorais de defesa e aumento de reação leucocitária geral, com ativação do sistema de imunocompensação de defesa. Além disso, uma melhora na microcirculação e estímulo ao nível de fibroblastos, com produção de fibras elásticas e colágenas mais ordenadas que são fatores que determinam um melhor padrão de cicatrização tecidual (GENOVESE *et al.*, 1992).

Al-Watban *et al.* (2000), num estudo com ratos, avaliaram a eficácia do laser de HeNe, comparados com drogas que tem função de aumentar a microcirculação, o consumo de Oxigênio, a síntese de ATP e fornecimento de nutrientes; são elas o “polygen” (droga extraída de proteína animal) e “Socoseryl” (não protéica). Assim, apesar de usar vias diferentes, estas drogas têm o objetivo final semelhante que é o de síntese de ATP. O laser foi utilizado de forma contínua com potência de 40mW e também foi utilizado um expensor de feixe para que o raio recobrisse toda área da ferida oval

previamente confeccionada que tinha  $3,8\text{cm}^2$  resultando em uma densidade de potência de  $10,53\text{mW/cm}^2$ . As aplicações do laser foram feitas diariamente com uma dose de  $20\text{J/cm}^2$  até a cicatrização completa da ferida. A área da ferida foi mensurada com um compasso e evidenciou-se que a associação entre laser e as drogas só teve diferença estatisticamente significativa quando comparado com o grupo controle, mas não houve diferença estatística com relação ao grupo só de laser. O estudo conclui que todos os grupos experimentais melhoraram consideravelmente o processo de reparo, quando comparados com o grupo controle.

Em 2002, Mendez realizou um trabalho para verificar o efeito do laser não-cirúrgico no processo de cicatrização, onde utilizou comprimentos de onda de 685nm e 830nm e também a associação dos dois comprimentos de onda, com as doses de  $20\text{J/cm}^2$  e  $50\text{J/cm}^2$  e os tempos de observação foram de três, cinco e sete dias. Após análise histológica para colágeno, pela técnica de coloração de Picrosírius, observou-se que nos grupos experimentais onde houve associação dos comprimentos de onda com as duas doses testadas e o  $\lambda 830\text{nm}$  com dose de  $50\text{J/cm}^2$  demonstraram maior quantidade de colágeno no final do período inflamatório. Sendo que, destes três, o melhor foi o grupo com associação de menores dose e  $\lambda$ , sendo de  $10\text{J/cm}^2$  para cada comprimento de onda. A autora atribuiu a estes resultados as diferentes formas de absorção e penetração dos dois comprimentos de onda testados, sendo um vermelho e um infravermelho, pois o estímulo superficial como também em profundidade pode ter sido o fator responsável pela melhor formação de colágeno.

Ao investigar a ação da laserterapia nos fibroblastos e conseqüentemente no processo de cicatrização, estudo recente foi executado por Medrado *et al.*, (2003) realizaram feridas circulares de 8mm diâmetro em dorsos de ratos e trataram com o laser de arseneto de Gálio e Alumínio com  $\lambda 670\text{nm}$  (espectro vermelho) e 9mW de potência, onde o primeiro grupo experimental recebeu densidade de energia de  $4\text{J}/\text{cm}^2$  e o segundo grupo recebeu  $8\text{J}/\text{cm}^2$ . O diâmetro das feridas foi aferido com régua flexível em vários dias de pós-cirúrgico. A partir do sétimo dia, as úlceras tratadas com laserterapia mostraram-se menores, com relação ao controle, enquanto que o grupo que recebeu  $4\text{J}/\text{cm}^2$  obteve maior redução no tamanho da ferida, bem como exibiu significativamente mais células marcadas com actina/desmina que o de densidade de potência de  $8\text{J}/\text{cm}^2$ . A proliferação de fibroblastos e a deposição de colágeno acompanharam a proliferação vascular, alterações estas percebidas no quinto dia. A partir do sétimo dia houve remodelação das lesões, com as fibras colágenas mais organizadas e as células inflamatórias mostraram-se em apoptose. No décimo quarto dia todas as feridas encontraram-se completamente cicatrizadas.

Através da irradiação de laser não ablativo em cultura de fibroblastos de pele humana, Benarska *et al.* (1998) observaram um notável aumento no crescimento destas células após receberem irradiação de laser vermelho, com  $\lambda 670\text{nm}$ , com densidade de energia de 2 e  $12\text{J}/\text{cm}^2$ . Nos períodos mais breves de observação, sendo quatro e oito horas e um dia, não foi observado aumento estatisticamente significativo na cultura estas células após a irradiação, porém a partir da primeira hora e de dois até cinco dias, percebeu-se grande diferença no crescimento celular, quando comparado com o grupo controle. Os autores consideram que este aumento inicial deve-se ao aumento da



atividade enzimática mitocondrial, mas que o incremento de fibroblastos resulta, em uma certa influência estimulante, da aplicação da irradiação do laser vermelho, em longo prazo, na proliferação de fibroblastos, devido ao incremento de atividade de enzima mitocondrial, síntese de ATP e conseqüentemente síntese de colágeno.

Em 2001, Nascimento realizou um estudo para verificar os efeitos da irradiação do laser diodo de  $\lambda 670\text{nm}$  e  $\lambda 685\text{nm}$  em feridas excisionais circulares com 8mm de diâmetro. A autora variou a potência em 2mW, 15mW e 25mW em ambos os comprimentos de onda, mas com dose fixa diária de  $10\text{J}/\text{cm}^2$ . As observações histológicas, ao oitavo dia, todos os grupos mostraram-se com crosta e apenas princípios de reepitelização, observando-se apenas no grupo irradiado com  $\lambda 670\text{nm}$  e 25mW epitelização completa. Também se verificaram áreas de necroses superficiais, predominância de células inflamatórias mononucleares, e discreta proliferação de fibroblastos. A autora sugere os melhores resultados para os grupos irradiados com menor comprimento de onda.

Utilizando técnica de imunocitoquímica, em 2002, Campanha, analisou os efeitos do laser de GaAlAs ( $\lambda 685\text{nm}$ ) e da luz polarizada ( $\lambda 400\text{-}2000\text{nm}$ ) e obteve resultados positivos no processo de cicatrização de feridas em derme de ratos, com ambos os recursos. O autor evidenciou maior neoformação de colágeno, através da técnica de Picosírius no grupo irradiado com laser, bem como menor expressão de miofibroblastos, apontando  $20\text{J}/\text{cm}^2$  como a melhor dose.

Uma Investigação sobre avaliação das modificações nos níveis de colágeno durante o processo cicatricial após anastomose microarterial laser assistida foi realizada com laser diodo de  $\lambda 830\text{nm}$ . Tang *et al.*, (1998) realizaram laparotomias de parte da artéria abdominal da aorta de 36 ratos machos. Foi fornecido feixe de raios de laser diodo de  $\lambda 830\text{nm}$  de comprimento de onda, em modo contínuo, focado através de fibra óptica ( $300\mu\text{M}$ ) e transmitida ao vaso através de um micromanipulador, acoplado ao microscópio operatório; forneceram diâmetro da ponteira de 1mm e guiado por uma luz vermelha de diodo ( $\lambda 670\text{nm}$ ) constituindo assim, o protótipo utilizado. O tratamento com laser consistiu na irradiação das paredes arteriais, face a face, com disparos de 2W de potência e 8s de duração, fornecendo então uma dose de  $254\text{W}/\text{cm}^2$ . Eram aplicados em cada aorta entre 48 e 60 disparos. O total da dose de energia era de  $897\pm 52\text{J}$ . Logo após o tratamento a laser as paredes dos vasos apresentaram uma leve transparência e coloração esbranquiçada. A partir do décimo dia havia dilatação do lúmen de toda aorta abdominal tratada com laser e o diâmetro do vaso ficou quase o dobro do diâmetro do vaso antes do tratamento a laser e também comparado com o grupo controle. O nível de colágeno foi maior no décimo dia onde teve um pico e retornou ao nível normal nos dias seguintes.

Através de técnicas bioquímicas para medir produção, solubilidade e ligações cruzadas de colágeno em reparo de secções de tendão de Aquiles, Reddy *et al.* (1998) evidenciaram o maior índice total de colágeno no grupo tratado com laserterapia de  $\lambda 632,8\text{nm}$  e  $1\text{J}/\text{cm}^2$  por 14 dias, quando comparado ao grupo controle, bem como mudanças estatisticamente significante de ligações cruzadas no grupo experimental.

Kreisler *et al.* (2002) trabalharam com o laser diodo GaAlAs de  $\lambda$  igual a 809nm e com potência de 10mW no modo de emissão contínuo, para estimulação *in vitro*, de proliferação de fibroblastos gengivais humanos, variando as densidades de energia e regimentos de irradiação. Os tempos de irradiação variaram de 75, 150 e 300 segundos com densidades de energias de  $1,96\text{J}/\text{cm}^2$  ;  $3,92\text{J}/\text{cm}^2$  e  $7,84\text{J}/\text{cm}^2$  . Neste estudo, 22 placas de culturas serviram de controle e outras 22 para os grupos experimentais. Foram feitas três irradiações repetidas a cada 24 horas. Considerando que o efeito do laser nas células são dependentes do comprimento de onda, bem como da dose de irradiação, estudos anteriores têm demonstrado que o espectro de absorção dos fibroblastos varia entre  $\lambda 800$  e  $\lambda 830\text{nm}$ . Os resultados obtidos neste estudo revelaram que a luz laser de baixa intensidade com comprimento de onda de  $\lambda 809\text{nm}$  tem um considerável efeito estimulante no processo de crescimento fibroblástico e conseqüentemente melhor reparo de feridas da cavidade bucal.

Embora inúmeros trabalhos evidenciem efeitos benéficos da laserterapia no processo de cicatrização, Walker *et al* (2000) não observou melhora na cicatrização de feridas realizadas em dorso de ratos previamente expostos aos raios gama. O tratamento proposto foi o laser de GaAlAs de  $\lambda 660\text{nm}$ , 15mW com doses de  $0,5\text{J}/\text{cm}^2$  e  $1,5/\text{cm}^2$  . O resultado foi atribuído ao prejuízo causado pelos raios-X aos ciclos celulares, resultando na reduzida proliferação de fibroblastos.

Avaliando a laserterapia de HeNe com  $4\text{J}/\text{cm}^2$  em cicatrização de feridas cutâneas, verificou-se que o tempo de fechamento total clínico das feridas do grupo controle foi de sete dias, enquanto no grupo experimental este tempo foi de apenas cinco

dias. Também no grupo teste foi superior a fibroplasia, neovascularização, infiltrado leucocitário, colagenização e resistência à ruptura, podendo ser parcialmente justificada pela precoce epitelização oferecida pela laserterapia (BISHT *et al*, 1999).

Com a hipótese de que a laserterapia de HeNe com  $\lambda 632,8\text{nm}$ , em doses de  $1\text{J}/\text{cm}^2$ , por três semanas, facilitaria o reparo de feridas cutâneas em ratos diabético-induzidos; Reddy *et al.* (2001) observaram produção acelerada de colágeno, aumento da estabilidade biomecânica das cicatrizes, e que a elasticidade das feridas do grupo teste foram notavelmente melhor, aproximando-se dos valores da pele intacta.

Comparando aplicações de laser  $\lambda 810\text{nm}$ , numa potência de 3W, 20W de luz halógena em feridas com curativos de gaze, géis e membrana, Lilge *et al.* (2000) tiveram o propósito de verificar se há transiluminação da ferida com laser, e se houvesse, sob quais circunstâncias deveria ser aplicada a laserterapia para esta finalidade. Perdas de radiação no curativo são por conta da dispersão e absorção de luz pelo material do curativo. Esta dispersão é devido às diferenças de índice de refração entre o material e o meio ambiente. Essas diferenças de índice de refração são menores na gaze úmida e em curativos com géis resultando assim em melhor transmissão de luz. O melhor resultado, nesse ponto de vista, foi o curativo com membrana, porque é feita com material homogêneo, apresentando menor absorção da luz e dando assim, uma alta transmissão das radiações estudadas. Também, estes curativos são bons porque podem ser deixados na ferida por até uma semana, atenuando as desvantagens de trocas de curativos. O estudo conclui que para alguns curativos, é possível aplicar a radiação sem tirá-lo, caso a ferida não seja sangrante e também não esteja seca. A remoção causaria a interrupção do processo de cicatrização, enquanto a transiluminação elimina o estresse

tendo então papel positivo. A dispersão e a perda por absorção podem ser compensadas por aumento do tempo de irradiação. Estes resultados comprovam a importância da laserterapia em feridas crônicas de difícil cicatrização e que necessitam de curativos.

O efeito clínico do tratamento de laser de  $\lambda 635\text{nm}$  e  $\lambda 690\text{nm}$  em queimaduras de  $1,54\text{cm}^2$  de área em ratos foi verificado por Schlager *et al.* (2000). Os parâmetros clínicos do estudo foram os aspectos visuais de edema e hiperemia, estabelecendo escores para estes fatores da sua expressão variando de zero a dois. Os resultados dos estudos não mostraram nenhuma evidência clínica de melhor reparo nas feridas tratadas com laser.

O estudo realizado por Nascimento em 2001 irradiou feridas excisionais com laser diodo em dois comprimentos de onda (670nm e 685nm). Os resultados mostraram, por meio de observações histológicas, efeito biomodulatório positivo no processo de reparo em ambos os comprimentos de onda, entretanto o melhor resultado foi verificado com irradiação de menor comprimento de onda.

AKASAKA *et al.* (2004), acreditam que a promoção da apoptose fibroblástica e uma menor formação de tecido de granulação pode conduzir a menor formação de fibrose no reparo, e que isso pode ser induzido sem diminuição na força de tensão do tecido recém reparado, com a administração de fator de crescimento fibroblástico básico. E também pensando no inconveniente da formação de cicatriz hipertrófica em feridas por queimaduras, Webb e Dyson (2003) utilizaram o laser diodo de GaAlAs,  $\lambda 880\text{nm}$ , 16mW, 2,4 e  $4\text{J}/\text{cm}^2$  em linhagens de fibroblastos humanos derivados de cicatrizes normais e hipertróficas, onde os autores obtiveram redução celular.

Oliveira (2002) em seu estudo avaliou o efeito da fototerapia em feridas excisionais circulares realizadas com laser de CO<sub>2</sub>, utilizando laser diodo de GaAlAs ( $\lambda$ 685nm e 40mW) e luz polarizada nas doses de 20 e 40J/cm<sup>2</sup>. Os resultados mostraram influência positiva no processo de reparo em ambas as terapias. Porém, a dose de energia tem influência no tratamento com luz polarizada, onde foi observada diminuição da imunexpressão dos miofibroblastos apenas com dose de 40J/cm<sup>2</sup>, entretanto, esta não influenciou o tratamento com o diodo utilizado.

## **PROPOSIÇÃO**

O presente estudo teve como objetivo avaliar, através da análise histológica e imunocitoquímica, os efeitos da laserterapia nos comprimentos de onda de  $\lambda$ 660nm e  $\lambda$ 830nm no processo de reparo de feridas cutâneas em dorso de ratos realizadas com bisturi e laser de CO<sub>2</sub>.

## METODOLOGIA

O protocolo de pesquisa foi submetido à apreciação do Comitê de Ética do Laboratório de experimentação animal da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia e aprovado em 29 de novembro de 2002 (anexo 1).

O presente estudo respeitou todos os Princípios Éticos de Experimentação Animal, bem como as normas Didático-científica da vivisseção de animais, de acordo com a lei 6.638, de 08 de maio de 1979 (GOLDIM, 1995).

### QUADRO 1: Classificação das variáveis do estudo (Soares, 2006)

<p>➤ Variáveis independentes:</p> <p style="text-align: center;"><b>TRATAMENTO</b></p> <p>1. Bisturi convencional</p> <p>2. Laser de CO<sub>2</sub></p> <p>3. Terapia com laser vermelho</p> <p>4. Terapia com laser infravermelho</p> <p><u>Variáveis qualitativas, dicotomizada</u></p>	<p>➤ Variáveis dependentes:</p> <p style="text-align: center;"><b>RESPOSTA TECIDUAL</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Edema</li> <li>• Neovascularização</li> <li>• Infiltrado inflamatório</li> <li>• Deposição de colágeno</li> <li>• Miofibroblastos</li> <li>• Fibroblastos</li> </ul> <p style="text-align: center;"><u>Variáveis ordinais (escores)</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Crosta</li> <li>• Epitélio</li> <li>• Interface plana do epitélio</li> </ul> <p><u>Variáveis qualitativas, dicotomizada</u></p>
---	---

➤ **Equipamentos Utilizados:**

1. Laser de alta potência (laser ablativo)

O aparelho utilizado foi o modelo SHARPLAN 20C® (Laser Industries, Israel) de  $\lambda 10.600\text{nm}$ , e para a realização deste estudo, o equipamento foi ajustado na potência de 5W, com o modo de produção em super pulso, o modo operacional de exposição contínuo e diâmetro do raio de 0,2mm (Figura 2).

2. Laser de Baixa Potência (laser terapêutico ou não ablativo)

O aparelho utilizado foi o diodo modelo BioWave (Kondortech, São Carlos, SP) que possui duas ponteiros independentes as quais emitem laser em dois comprimentos de onda diferentes: diodo de Arseneto de Gálio e Alumínio (GaAlAs) com  $\lambda 660\text{nm}$ , espectro vermelho, ajustado na potência (P) de 30mW, modo contínuo e a outra ponteira emite laser de índio gálio alumínio e fósforo (InGaAlP) no espectro infravermelho de  $\lambda 830\text{nm}$ , com potência de 40mW, modo contínuo e diâmetro do feixe na ponteira de 3mm (Figura 3).

➤ **Modelo Experimental e seu manuseio**

O modelo animal escolhido foi o rato (*Ratus norvegicus albinus*, linhagem Wistar), por ser de fácil obtenção, manuseio e manutenção, além de ser bastante utilizado em estudos experimentais. Os animais atenderam aos seguintes critérios:



Dos Critérios de Inclusão / Exclusão:

1. Adultos jovens entre oito e nove semanas de vida;
2. Serem machos;
3. Não serem portadores de doenças sistêmicas;
4. Não serem portadores de anomalias;
5. Apresentarem bom estado nutricional;
6. Possuírem peso médio de 250g;
7. Chegarem ao final do período relativo aos seus grupos em bom estado de saúde;
8. Não apresentarem complicações como infecções, necroses, dissimulação da lesão, debilitação do estado geral durante o período de teste.

A acomodação dos animais, os procedimentos cirúrgicos e sessões de laserterapia, bem como os sacrifícios foram realizados no Laboratório de Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia.

Os animais foram mantidos em caixas plásticas apropriadas, com três animais cada, devidamente identificadas quanto aos subgrupos. A manutenção do biotério foi realizada diariamente, onde as caixas foram lavadas com água e sabão e desinfetadas com hipoclorito de Sódio a 1%. Também foram mantidas condições ambientais de temperatura, umidade e luminosidade, bem como oferecida dieta livre e padronizada própria para roedores (purina®) e água “*ad libitum*”.

➤ **Descrição da amostra do estudo**

Foram utilizados 54 animais, divididos aleatoriamente em seis grupos com nove animais cada, da seguinte forma:

Nos grupos 1, 2 e 3, os animais foram submetidos à excisão em seu dorso, utilizando o cabo duplo adaptado e lâminas de bisturi número 15. Sendo:

**GRUPO CONTROLE DE BISTURI:**

- **G1:** não foi submetido a laserterapia,

**GRUPOS EXPERIMENTAIS DE BISTURI:**

- **G2:** recebeu laserterapia de  $\lambda=660\text{nm}$ ,  $D= 20\text{J}/\text{cm}^2$  e  $P=30\text{mW}$ ,
- **G3:** recebeu laserterapia de  $\lambda=830\text{nm}$ ,  $D= 20\text{J}/\text{cm}^2$  e  $P=40\text{mW}$ .

Nos grupos 4, 5 e 6, os animais foram submetidos à excisão em seu dorso utilizando o laser de  $\text{CO}_2$ , utilizando-se a ponteira reta, sendo:

**GRUPO CONTROLE DE LASER DE  $\text{CO}_2$ :**

- **G4:** Não foi submetido a laserterapia,

**GRUPOS EXPERIMENTAIS DE LASER DE  $\text{CO}_2$ :**

- **G5:** Recebeu laserterapia de  $\lambda =660\text{nm}$ ,  $D= 20\text{J}/\text{cm}^2$  e  $P=30\text{mW}$ ,
- **G6:** Recebeu laserterapia de  $\lambda =830\text{nm}$ ,  $D= 20\text{J}/\text{cm}^2$  e  $P=40\text{mW}$ .

Todos os grupos foram compostos por nove animais e subdivididos de acordo com os tempos de sacrifício de três dias (subgrupo A), de oito dias (subgrupo B) e de 14 dias (subgrupo C). A distribuição dos grupos pode ser observada no Quadro 2 a seguir.

**QUADRO 2:** Distribuição dos grupos de estudo (SOARES, 2004)

GRUPOS	Nº DE ANIMAIS	DESCRIÇÃO	SUBGRUPOS*	TEMPOS DE OBSERVAÇÃO
<b>G1</b>	9	<b>CONTROLE DO BISTURI</b> Excisão com bisturi convencional	G1 A	3 dias
			G1 B	8 dias
			G1 C	14 dias
<b>G2</b>	9	Excisão com bisturi convencional + irradiação com $\lambda 660\text{nm}$	G2 A	3 dias
			G2 B	8 dias
			G2 C	14 dias
<b>G3</b>	9	Excisão com bisturi convencional + irradiação com $\lambda 830\text{nm}$	G3 A	3 dias
			G3 B	8 dias
			G3 C	14 dias
<b>G4</b>	9	<b>CONTROLE DO CO<sub>2</sub></b> Excisão com laser de CO <sub>2</sub>	G4 A	3 dias
			G4 B	8 dias
			G4 C	14 dias
<b>G5</b>	9	Excisão com laser de CO <sub>2</sub> + irradiação com $\lambda 660\text{nm}$	G5 A	3 dias
			G5 B	8 dias
			G5 C	14 dias
<b>G6</b>	9	Excisão com laser de CO <sub>2</sub> + irradiação com $\lambda 830\text{nm}$	G6 A	3 dias
			G6 B	8 dias
			G6 C	14 dias

\*Os grupos foram divididos em subgrupos, de acordo com os tempos de sacrifício.

### ➤ Técnica Cirúrgica

Os animais foram submetidos à anestesia geral com a injeção intraperitoneal de uma solução estéril de hidrato de Cloral a 10% em água destilada, na posologia de 0,35 ml/100g (A FORMULA<sup>®</sup>, farmácia de manipulação). Após a tricotomia por arrancamento, o animal foi levado até a mesa de cirurgia e colocado em decúbito dorsal, seguindo-se a assepsia/anti-sepsia com uma solução de Clorexidina a 2%, secagem da área com compressas estéreis e colocados campos estéreis.

Foram criadas feridas excisionais no dorso dos animais com as dimensões de 1cm de extensão por 1mm de largura e a espessura incluindo a epiderme e derme. Para os

animais dos grupos excisados com bisturi, utilizamos dois cabos de bisturi unidos por um parafuso, possibilitando a regulação da distância entre as lâminas, podendo assim criar uma ferida excisional de espessura padronizada. A distância utilizada entre os cabos foi de 1mm, e a estes cabos foram adaptadas duas lâminas número 15. Os cabos de bisturi adaptados e o procedimento cirúrgico com sua utilização são mostrados nas Figuras 4 e 5 seguir.

Nos animais dos grupos do laser foram realizadas feridas excisionais com o laser cirúrgico de CO<sub>2</sub> também medindo 1cm de extensão por 1mm de largura. O aparelho foi utilizado de modo focado, sendo P= 5W em RSP, CW (Figura 6).

Após, realizados os cortes, os quatro pontos para serem irradiados ao redor da ferida foram tatuados com tinta de nanquim.

### ➤ **Laserterapia**

Ao término das cirurgias, os grupos a serem irradiados receberam a primeira irradiação. Com dose de 20J/cm<sup>2</sup> fracionadas em quatro referidos pontos ao redor da ferida com 5J/cm<sup>2</sup> cada ponto, sendo a irradiação repetida a cada 48hs (Figura 7). Os animais receberam, de acordo com o tempo de sacrifício, 40, 80 ou 140J/cm<sup>2</sup> no total do tratamento. Sendo assim, os subgrupos “A” receberam duas doses de 20J/cm<sup>2</sup> cada (40J/cm<sup>2</sup>) e foram sacrificados no terceiro dia após a cirurgia. Os subgrupos “B” receberam quatro doses de 20 J/cm<sup>2</sup> cada (80J/cm<sup>2</sup>) e foram sacrificados no oitavo dia

depois da cirurgia. E os subgrupos “C” receberam sete doses de  $20\text{J}/\text{cm}^2$  cada ( $140\text{J}/\text{cm}^2$ ) e foram sacrificados no décimo quarto dia do experimento.

➤ **Obtenção da amostra tecidual**

Durante todo o período do experimento, os animais foram inspecionados diariamente quanto ao ferimento propriamente dito, bem como superficialmente a sua saúde geral e se caso fosse detectado algum distúrbio, o animal seria excluído da amostra.

Ao término dos tempos experimentais (3, 8 e 14 dias), os animais foram sacrificados com menor sofrimento, através de uma *overdose* intraperitoneal de anestésico geral. Após, constatada a morte dos animais, foi realizada a remoção do tecido e observado seus aspectos macroscópicos.

Foram realizadas biópsias excisionais com margem envolvendo o tecido circunvizinho ao ferimento, resultando num retalho de  $2\text{cm}^2$ . Para tanto foram utilizadas lâminas de bisturi de número 11. Os espécimes removidos foram fixados em formol a 10% durante 24h (Figura 8).

➤ **Processamento Histológico:**

Após a realização da macroscopia, os espécimes foram processados pela técnica de rotina, incluídos em parafina e obtidos os cortes histológicos em micrótomo,

transversalmente a ferida com uma espessura de 5µm. Foi feita a coloração de rotina com Hematoxilina e Eosina (H&E), bem como a coloração especial Picrosírius vermelho (*sírius red*) (anexo 3). Estes procedimentos foram realizados no Laboratório de Patologia Bucal do Departamento de Propedêutica e Clínica Integrada da FOUFBA.

#### ➤ **Procedimento Imunocitoquímica**

Após processamento em H&E e Picrosírius, foram obtidos da mesma forma, cortes de mesma espessura (5µm) para a confecção das lâminas na técnica imunocitoquímica. Esta tem como base reações bioquímicas específicas, ou a interação macromolecular de alta afinidade. O resultado final desta reação é a produção de compostos insolúveis, corados, ou eletron-densos, que possibilitam a localização de substâncias específicas nos cortes dos tecidos através do uso do microscópio de luz .

Os cortes histológicos foram aderidos em lâminas previamente limpas em solução sulfocrômica para evitar o descolamento dos cortes durante as reações. As lâminas foram colocadas em estufa a 37°C para fixação dos cortes por 24h (incubação). Neste estudo foi utilizada a técnica da estreptoavidina-biotina peroxidase (BOENISH, 1989) para caracterização fenotípica de células fibroblásticas e miofibroblásticas. Para tanto foram utilizados marcadores imunohistoquímicos:

- Vimentina – anticorpo anti-ratos, isótopo IgG1, monoclonal, clone V9, pré-diluído (Biogenex<sup>®</sup>), pronto para o uso. Possui especificidade para células mesenquimais, sobretudo fibroblastos e músculo liso.
- $\alpha$ -Actina do músculo liso – anticorpo anti-ratos, isótopo IgG2, monoclonal, clone 1A4, pré-diluído (Biogenex<sup>®</sup>). Possui especificidade por fibroblastos com características fenotípicas de músculo liso (miofibroblastos).

Os procedimentos imunocitoquímicos foram realizados no Laboratório de Imunopatologia do serviço de Anatomia Patológica do HUPES e seguimos a seqüência técnica padrão (BOENISH, 1989), respeitando os preceitos oferecidos pelo fabricante dos respectivos prospectos dos anticorpos (anexo 4).

#### ➤ **Técnica Imunocitoquímica**

Após a incubação das lâminas procedeu-se a desparafinização através de dois banhos de imersão no xilol por cinco minutos cada, seguido de dois banhos de imersão em álcool absoluto por três minutos e então hidratadas em água corrente e destilada, posteriormente estabilizadas em tampão PBS (*Phosphate buffered saline*).

Para a reação com marcador celular anti-vimentina foi necessária a realização da recuperação antigênica em calor úmido. Para a utilização do imunomarcador anti-actina não foi necessária a recuperação antigênica.

- Recuperação antigênica

Para marcação pelo anticorpo anti-vimentina as lâminas com os cortes foram posicionadas em um artefato de metal próprio para o procedimento e imersas em solução tampão de citrato em pH de 7,6 e levadas ao banho-maria na temperatura de 90° C, por trinta e cinco minutos.

Após este procedimento, as lâminas foram lavadas e imersas em PBS e em seguida foi realizado o bloqueio da peroxidase.

- Bloqueio da peroxidase:

O bloqueio da peroxidase endógena, ou seja, bloqueio das reações inespecíficas foi realizado utilizando peróxido de Hidrogênio a 10% por 25 minutos em temperatura. Em seguida, as lâminas foram lavadas com água corrente e estabilizadas em PBS.

- Incubação do anticorpo primário:

Após remover o excesso de PBS com gaze, os cortes do tecido foram delimitados com a caneta hidrofóbica, para evitar escoamento do anticorpo. Foram depositados em cima de cada corte duas gotas de anticorpo primário anticorpos monoclonais pré-diluídos (anti-actina, antivimentina). Foram realizados imunomarcação de cortes de pele para



controles externos positivo, tecido indicado no prospecto do anticorpo utilizado. As paredes dos vasos funcionaram como controle interno positivo. As lâminas foram dispostas em uma câmara úmida e incubadas por 60 minutos em estufa a 37°C.

- Incubação do anticorpo secundário:

Após estabilização em PBS e remoção do excesso do líquido, colocou-se uma gota de anticorpo secundário, seguido de incubação em estufa por 30 minutos a 37°C. Após nova lavagem com PBS, segue-se a reação incubando-se as lâminas com o complexo streptoavidina-biotina-peroxidase também pré-diluído por 30 minutos a 37°C (BOENISH, 1989).

A revelação foi obtida com o cromógeno 3'3'diaminobenzidina (DAB) e aguardado por alguns minutos para a visualização da reação e lavagem em PBS.

- Contra-coloração e montagem das lâminas

A contra-coloração foi realizada com Hematoxilina de Harris, por 30 segundos, desidratadas em álcool absoluto, clarificadas em xilol e recobertos com lamínulas de vidro sob bálsamo do Canadá.

### ➤ **Análise Histológica**

Os cortes histológicos corados com H&E foram avaliados sob microscopia de luz através de análise qualitativa, observando características do reparo tecidual. A avaliação do picrosírius nos ofereceu uma análise descritiva e semiquantitativa da deposição de fibras colágenas observadas.

Considerou-se zero (0) para ausência e um (1) para presença dos seguintes critérios: crosta, revestimento epitelial e interface plana do epitélio.

A gradação de zero a três foi utilizada para critérios como edema, neovascularização, infiltrado inflamatório, eritema, fibroblasia, colagenização evidenciada pelo picosírius; sendo zero (0) para ausente, um (1) para leve, dois (2) para moderado e três (3) para intenso (anexo 5).

➤ **Análise imunocitoquímica**

A avaliação imunocitoquímica objetivou verificar a presença de células com fenótipo de miofibroblastos através da imunoexpressão citoplasmática pela alfa-actina músculo liso ( $\alpha$ -SMA) e a imunoexpressão citoplasmática da vimentina, para observar concentração de fibroblastos.

As imunomarcações de anti-vimentina e anti-actina, evidenciando a proliferação fibroblástica e presença de miofibroblastos respectivamente, foi considerado zero (0) para ausente, um (1) para leve, dois (2) para moderado e três (3) para intenso (anexo 5).

## RESULTADOS

### ➤ Descrição Macroscópica

Os animais sacrificados ao terceiro dia apresentaram crosta extensa e de coloração acastanhada escura em quase todos os espécimes, sendo ausente em apenas dois. Nos espécimes onde não havia crosta, observou-se cicatriz discreta medindo em torno de 6mm no grupo de laser e 8mm no grupo de CO<sub>2</sub>. Nos grupos sacrificados ao oitavo dia, observou-se também crosta em sete espécimes, porém, desta vez mais delgada e de coloração mais escura, marrom. Os animais que foram sacrificados após 14 de Arseneto de Gálio e Alumínio (GaAIs) dias apresentavam-se sem crosta e com uma tênue linha no local da excisão, por vezes imperceptível. Alguns espécimes já se apresentavam com a região de reparo recoberta por pêlo.



Figura 8: Fragmento de pele de espécime do grupo controle de bisturi (1A), ao décimo quarto dia. Momento da biópsia (SOARES, 2006)

➤ **Análise Histológica por Microscopia de Luz**

1. ANÁLISE HISTOLÓGICA AO TERCEIRO DIA

*GRUPOS DO BISTURI AO TERCEIRO DIA*

Os espécimes sacrificados ao terceiro dia após a cirurgia mostraram ao exame histológico fragmentos de pele exibindo úlcera profunda recoberta por crosta. Subjacente, evidenciou-se faixa de tecido de granulação composta por neocapilares às vezes congestos e quantidade variável de fibroblastos fusiformes e triangulares. Em alguns espécimes também foi evidenciado extravasamento de hemácias e no subgrupo controle também foi observado edema intersticial mais marcante que nos grupos submetidos a laserterapia não ablativa.

O infiltrado inflamatório observado nos subgrupo controle e no subgrupo irradiado com  $\lambda 660\text{nm}$  teve predominância de células mononucleares, enquanto que no subgrupo irradiado com  $\lambda 830\text{nm}$  percebeu-se moderada presença de linfócitos, indicando cronicidade. Dois espécimes do subgrupo irradiado com  $\lambda 830\text{nm}$  apresentaram epitélio pavimentoso em organização e atrofia subjacente, presença de grânulos de queratohialina com filamentos delicados sugerindo início da formação da camada de Queratina, como pode ser visto na Figura 9. Destes, apenas um animal apresentou a interface do epitélio plana.

Ao Picrosírius foram observados os elementos celulares imersos a poucas e delicadas fibras colágenas. Já nos subgrupos irradiados com laser não ablativo, em ambos os comprimentos de onda apresentaram-se com maior maturação de colágeno e maior

deposição percebida no grupo irradiado com  $\lambda 830\text{nm}$  (subgrupo 3A), embora que as fibras encontravam-se ainda fragmentadas em todos os grupos.

A presença de maior quantidade de miofibroblastos imunomarcados pela  $\alpha$ -actina pode ser conferido nas Figuras 21 e 22, nos subgrupos operados com bisturi, bem como maior concentração de fibroblastos, evidenciado pela imunomarcção pela vimentina (Figura 23).

### GRUPOS DE LASER DE $\text{CO}_2$ AO TERCEIRO DIA

Os espécimes operados com laser de  $\text{CO}_2$  mostraram pele exibindo úlcera recoberta por crosta espessa. Subjacente, evidenciou-se ainda fibrina em continuidade com o tecido de granulação composto por fibroblastos fusiformes e triangulares, e vasos sanguíneos congestos. O infiltrado inflamatório variou de leve a intenso, porém freqüentemente intenso, por vezes estendendo-se até camadas mais profundas da derme. O infiltrado inflamatório foi predominantemente misto, apresentando-se por vezes crônico no subgrupo de controle e no subgrupo irradiado com  $\lambda 660\text{nm}$ . Apenas no subgrupo submetido a laserterapia de  $\lambda 830\text{nm}$  apresentou espécime com inflamação aguda. Todas os elementos celulares estavam em meio a moderado edema intersticial, sendo mais discreto nos subgrupos submetidos a laserterapia. Ao exame histológico pela técnica do Picrosírius observaram-se pobres fibras colágenas delicadas em maturação e fragmentadas. Pode-se observar nas Figuras 10, 11 e 12 os diferentes estágios de maturação do colágeno, onde nos espécimes irradiados com  $\lambda 830\text{nm}$  mostraram colágeno mais maduros.

## 2. ANÁLISE HISTOLÓGICA AO OITAVO DIA

### *GRUPOS DO BISTURI AO OITAVO DIA*

Os espécimes sacrificados após oito dias da cirurgia mostraram feridas cirúrgicas recobertas por epitélio pavimentoso estratificado queratinizado e fâneros (anexos) cutâneos ausentes. A interface plana só foi completada em alguns espécimes dos subgrupos que receberam laserterapia. Exocitose leucocitária e vacuolização citoplasmática foi mais evidente no grupo controle, bem como eventualmente com crosta superficial. Subjacente, foram evidenciados fibroblastos fusiformes jovens organizando-se paralelos a superfície (Figuras 24), bem como, vasos sanguíneos raramente congestionados de discreto a moderado infiltrado inflamatório linfocitário no subgrupo controle. Já nos subgrupos irradiados, este infiltrado inflamatório foi leve. De acordo com o Picosírius, foram verificadas fibras colágenas ainda delgadas e fragmentadas, porém mais maduras que no tempo de três dias. Também se pôde verificar nos espécimes irradiados (Figura 14) maior maturação e organização semelhante à derme adjacente que no grupo controle (Figura 13). Ainda percebe-se grande quantidade de miofibroblastos após oito dias de reparo, principalmente nos subgrupos excisados com bisturi, organizados de forma paralela com relação à superfície. (Figuras 24)

### GRUPOS DE LASER DE CO<sub>2</sub> AO OITAVO DIA

Os espécimes operados com CO<sub>2</sub> e sacrificados após oito dias apresentaram, ao exame histológico ferida coberta por epitélio pavimentoso estratificado queratinizado,

eventualmente atrófico no subgrupo irradiado com  $\lambda 660\text{nm}$ . Evidenciou-se crosta na superfície e neocapilares muitas vezes congestos, características mais freqüentes no grupo controle. O tecido de granulação composto por, fibroblastos jovens e desorganizados, infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear variando de leve a intenso no grupo controle, porém, linfócitos e neutrófilos foram marcantes nos subgrupos irradiados, mostrando-se um infiltrado inflamatório mais crônico. Também foi observado aparecimento de vacúolos de gordura, como pode ser visto na Figura 16. Ao observar os espécimes pela técnica de Picrosírius, todos estes elementos celulares encontravam-se distribuídos em meio a desorganizadas e delgadas fibras colágenas, porém um pouco mais maduras e organizadas nos subgrupos que receberam laserterapia. Pôde ser verificada uma maior semelhança do colágeno neoformado com o da derme adjacente (Figura 16), com relação ao grupo controle representado na Figura 1

### 3. ANÁLISE HISTOLÓGICA AO DÉCIMO QUARTO DIA

#### GRUPOS DO BISTURI AO DÉCIMO QUARTO DIA

Os espécimes deste grupo mostraram-se todos recobertos por epitélio pavimentoso estratificado queratinizado sem fâneros cutâneos e exibindo interface plana, sendo completa apenas no subgrupo irradiado com  $\lambda 660\text{nm}$  (Figura 18). Subjacente, evidenciou-se estreita faixa de derme composta por fibroblastos fusiformes, muitas vezes

jovens, intercalados entre si, bem como vasos sanguíneos e raros linfócitos. Quando observados pela técnica do Picrosírius, todos estes elementos celulares estavam dispersos entre feixes colagênicos espessos e bem maduros paralelos à superfície semelhante à derme adjacente, sendo esta semelhança mais evidente nos espécimes que receberam laserterapia, evidência que pode ser conferida nas Figuras 17, 18, 19, 20.

Após 14 dias da cirurgia, os miofibroblastos eram raros e mais percebidos no subgrupo de bisturi (Figura 25), porém o número de fibroblastos era grande (Figura 26).

### GRUPO DE LASER DE CO<sub>2</sub> AO DÉCIMO QUARTO DIA

Os espécimes, operados com bisturi, exibiram ao décimo quarto dia fragmento de pele revestido por epitélio pavimentoso estratificado queratinizado, ausência de fâneros cutâneos e interface plana, porém incompleta no subgrupo irradiado com  $\lambda 660\text{nm}$ . Ainda neste subgrupo, observou-se extravasamento de hemácias. Subjacente, evidenciaram-se fibroblastos fusiformes jovens e maduros intercalados e paralelamente entre si, além de vasos sanguíneos e raros linfócitos. De permeio, foram notados feixes colagênicos, ora pouco delgados, ora bastante maduros, com maior semelhança à derme adjacente nos subgrupos irradiados, quando observados pela técnica de Picrosírius.



**Comparação entre os grupos, com relação aos critérios histológicos analisados:**

Para os critérios analisados a seguir, sendo eles crosta, epitélio e pavimentação plana do epitélio, foram considerados como ausente, sendo utilizado o escore 0(zero) ou presente, como sendo o escore 1(um). A tabela 1 representa estes resultados encontrados nos grupos.

Já para as características histológicas de reparo de feridas como edema, neovascularização, infiltrado inflamatório, eritema, fibroblasia pelo H&E, colagenização pelo Picosírius, foram considerados escores que variaram entre zero (0) e três (3), ou seja, de ausente a marcante. Estes resultados estão bem representados na quadro3.

**TABELA 1:** Superfície histológica dos reparos (Soares, 2006)

TEMPOS	SUBGRUPOS	CROSTA		REVESTIMENTO EPITÉLIAL		INTERFACE PLANA DO EPITÉLIO	
		N	%	N	%	N	%
3 DIAS	G1	3	100	0	0	0	0
	G2	3	100	0	0	0	0
	G3	3	100	2	77,7	1	33,3
	G4	3	100	0	0	0	0
	G5	2	77,7	0	0	0	0
	G6	2	77,7	0	0	0	0
8 DIAS	G1	1	33,3	3	100	0	0
	G2	0	0	3	100	1	33,3
	G3	1	33,3	3	100	1	33,3
	G4	3	100	1	33,3	0	0
	G5	1	33,3	2	77,7	1	33,3
	G6	1	33,3	3	100	2	77,7
14 DIAS	G1	0	0	3	100	2	77,7
	G2	0	0	3	100	3	100
	G3	0	0	3	100	2	77,7
	G4	0	0	3	100	3	100
	G5	0	0	3	100	3	100
	G6	0	0	3	100	2	77,7

## DISCUSSÃO

Inúmeros são os parâmetros citados como responsáveis pelo dano térmico causado pelo superaquecimento dos tecidos irradiados pelo laser de CO<sub>2</sub> (SANDERS e REINISCH, 2000; FULTON; SHITABATA, 1999; PAYNE *et al.*, 1998; PATROCINIO; NICCOLI-FILHO, 2000; PINHEIRO, 1993; BRUNGNERA JÚNIOR; PINHEIRO, 1998). Em contrapartida incessantes investigações visam alternativas para sanar este inconveniente que é considerado pela maioria dos autores como a maior desvantagem do laser de dióxido de Carbono. Fulton e Shitabata (1999) ressaltam o tamanho dos pulsos como principais responsáveis por este efeito indesejado. Sanders e Reinisch (2000), relatam que mesmo com pulsos menores que o intervalo de descanso térmico do tecido ocorre importante dano térmico. Payne *et al.*, (1998) acreditam que o comprimento de onda interfere na espessura da zona de injúria térmica. Patrocínio e Niccoli-Filho (2000) mencionam as altas potências como responsáveis pelo retardo da cicatrização. Romanos *et al.* (1999) relataram que, além do aumento da potência utilizada, os danos térmicos também estão relacionados ao modo de entrega do raio, frequência e duração do pulso, além do comprimento de onda e do tempo de exposição.

Romanos *et al.* em 1999, relacionando diferentes potências aos efeitos térmicos, constataram que menores potências causam menos transtornos térmicos. Porém, neste estudo necessitou-se de maior profundidade de corte, utilizando-se, para tanto, maior potência para que a incisão fosse *realizada* com uma única irradiação, ou de maior tempo de irradiação o que também aqueceria ainda mais os tecidos. Assim, é importante estudos para verificar qual alternativa seria menos danosa aos tecidos periféricos ao

corde, se a utilização de maiores potências, maior tempo de irradiação ou se fazer a incisão por planos com várias irradiações.

Pesquisas apontam como boa e simples alternativa pra amenizar o dano térmico o resfriamento prévio do tecido (BRUGNERA JÚNIOR; PINHEIRO, 1998; PINHEIRO, 1998). Porém outros estudos desenvolveram técnicas mais sofisticadas como o sistema “CAST” preconizado por Howard *et al.* (1997). Embora os autores mostrarem um bom resultado, considera-se pouco prático e de viabilidade econômica discutível.

O conhecimento e controle de parâmetros que regem o funcionamento do laser se fazem necessário para contornar o efeito térmico indesejado. É oportuno a realização de mais estudos combinando as várias possibilidades de  $\lambda$ , densidades de potência, variação de pulsos, energia, tempo de irradiação, bem como lançar mão de recursos como resfriamento prévio do tecido. Com isso acredita-se na possibilidade da criação de um protocolo de utilização do laser de CO<sub>2</sub>, com o mínimo de dano térmico e com resultados mais precisos e seguros.

Tendo em vista as leis físicas que regem o fenômeno da entrega de energia do laser aos tecidos, onde sabemos que a distância focal é um fator importante, bem como características da superfície irradiada. Pois, a partir destes aspectos considerados sabemos que uma fração da energia será dispersa, refletida, absorvida e refratada. No atual estudo, com aplicação transcutânea, tendo a preocupação de encostar a ponteira na pele do animal, evitando os pontos pigmentados pelas tatuagens para que não alterasse a absorção da energia do laser. Mas, Lilge *et al.* (2000) avaliaram se havia diminuição considerável da absorção de energia do laser quando aplicadas através de diversos tipos de curativos e seus achados mostraram que algumas barreiras físicas

como certos curativos úmidos não alteraram necessariamente a eficácia do tratamento. Esta evidência revela a grande importância da laserterapia em tratamentos de feridas crônicas e extensas que precisam de curativos.

A ação hemostática do laser de CO<sub>2</sub> já se encontra bem descrita na literatura (MEDRADO *et al.*, 2003; FREITAS, 2000; FREITAS 1998; PINHEIRO *et al.*, 1997; FISHER *et al.*, 1983; RALDI *et al.*, 1999). Estudos pioneiros como os de Luomanen e Virtanen (1987); Luomanen *et al.* (1987); Luomanen e Virtanen (1991) relataram um aumento de formação vascular apenas no início (BISHT *et al.*, 1998), mas redução vascular ao longo do reparo. Nos achados deste estudo, encontrou-se um pequeno aumento da angiogênese nos grupos de laser de CO<sub>2</sub> com relação aos grupos de bisturi e ainda mais nos grupos seguidos de laserterapia. Porém percebeu-se também que entre os subgrupos do bisturi convencional houve uma pequena diminuição da neovascularização com o passar do tempo, já entre os subgrupos de laser de CO<sub>2</sub> houve um discreto aumento em tempo mais avançado do reparo. Isto pode ser devido ao fato de que feridas de CO<sub>2</sub> apresentam uma resposta inflamatória mais intensa, isto exige uma maior dinâmica vascular na área. Também, este fenômeno aponta para ação vascular do laser de baixa intensidade mais evidente quando associado ao laser de CO<sub>2</sub>.

Um outro fator importante a ser considerado é que neste estudo, a ferida realizada foi excisional, o que acarreta uma maior quantidade de tecido a ser reparado e maior distância entre os bordos, precisando de um maior tempo para reparação, e conseqüentemente de maior formação de tecido de granulação que nas feridas incisionais realizadas no estudo de Raldi *et al.* (1999), por exemplo. Ocorre o mesmo

com a grande destruição tecidual provocada pelo laser, em comparação com àquela provocada por bisturi, bem como a alteração térmica ocorrida nos tecidos adjacentes à ferida acarreta retardo no reparo devido à necessidade de maior formação de tecido de granulação para restabelecer a maior quantidade de tecido perdido. Confirmou-se neste estudo os resultados de Johnson *et al.* (1997), onde a resposta inflamatória provocada pelo laser de CO<sub>2</sub> foi mais intensa inicialmente e que se perdura por mais tempo.

Os resultados deste estudo mostraram que maiores diferenças nos padrões de reparo entre os subgrupos aconteceram nos três primeiros dias, apresentando-se semelhantes nos períodos seguintes. Este achado concorda com Romanos *et al.* (1999); Sanders e Reinisch (2000) e Koch e Egbert (1999) que relatam características histológicas muito semelhantes do reparo de feridas realizadas com laser de CO<sub>2</sub> e feridas convencionais acima de 14 dias de reparo.

Montenegro e Franco (1999) mencionam que, em processo de reparo normal, o infiltrado inflamatório crônico começa a aparecer no sétimo dia; Watanabe *et al.*, 1987 evidenciaram infiltrado inflamatório crônico só a partir do quinto dia em feridas realizadas com laser CO<sub>2</sub> sem a laserterapia, e Romanos *et al.* (1999) relataram inflamação aguda mais marcante em reparos de feridas a laser, tornando-se mais crônica após oito dias. Os resultados do presente estudo vão de encontro a estas evidências. No presente estudo observou-se, já ao terceiro dia, sinais de cronicidade como aparecimento de Linfócitos e nas incisões à laser e posterior laserterapia. O infiltrado inflamatório variou de misto a crônico em todos os tempos de observação. Isto pode indicar uma aceleração da fase inflamatória do reparo com o uso da laserterapia. Neste estudo foi observado que

a inflamação no grupo do laser de CO<sub>2</sub> se apresentou mais crônica, ou seja, em fase inflamatória mais avançada com relação às grupos de bisturi, embora esta ocorresse de forma mais intensa que no grupo do bisturi, corroborando os estudo de Johnson *et al.* (1997); Loumanem e Virtanem (1987); Loumanem *et al.* (1991); Edvard *et al.* (1996). Mas foi evidente a ação da laserterapia, acelerado as fases do processo inflamatório de feridas a laser, como já relatado em 1998 por Freitas.

Nascimento (2001) relatou em suas avaliações histológicas a proliferação de células adiposas, porém, em nossas observações, percebemos que as células adiposas provêm da camada de adipócitos localizada mais profundamente nos tecidos e com a remoção de camadas mais superficiais pela excisão, estas células emergem. E estas células em meio ao tecido de granulação têm uma função interessante. Sabe-se que a deposição dos componentes da matriz extracelular depende da ativação de células armazenadoras de gordura, que passam a produzir colágeno e se transformam em Miofibroblastos. Quando ativadas, estas células perdem progressivamente os grânulos de lipídeos ricos em ácido retinóico, passam a sintetizar componentes da matriz num estágio intermediário e, mais tarde, Actina e outras proteínas relacionadas terminando por se diferenciar em miofibroblastos (BRASILEIRO FILHO, 1998).

A formação de vacúolos de gordura também relatada por Romanos *et al.* (1999) também foi observada neste estudo, bem como grande número de Mastócitos nos reparos onde houve grande dano térmico. Esta evidência foi confirmada no presente estudo, onde se observou a freqüência destes vacúolos nos reparos de feridas a laser.

Acredita-se que este achado possa vir a ser material importante para investigações futuras.

Devido a ferida ter sido excisional neste estudo, acarretou, além numa maior quantidade de tecido de granulação, também uma maior distância entre os bordos, precisando conseqüentemente de um maior tempo para reepitelização. Apesar disto, em neste estudo já ao terceiro dia, em espécimes excisadas com bisturi e irradiadas com laserterapia de  $\lambda 830\text{nm}$ , foi encontrado epitélio estratificado, mesmo que delgado e em fase de organização, ainda com delicados filamentos de Queratina. Este fenômeno pode indicar uma aceleração do processo de reparo, onde a laserterapia, neste caso com comprimento de onda infravermelho favoreceu a proliferação celular, como menciona Karú (1987 e 1995).

Já nas excisões com laser  $\text{CO}_2$ , neste estudo, a reepitelização com potência de 5W, ocorreu após o oitavo dia e ainda assim, em fase de organização. Nos grupos onde se associou a laserterapia verificou-se uma maior organização deste revestimento epitelial inclusive o início da formação da camada de Queratina e interface plana do epitélio. Já nos estudo de Watanabe *et al.*, 1987, a epitelização ocorreu após cinco dias, nas feridas realizadas com laser de  $\text{CO}_2$ .

Os presentes resultados dos subgrupos de laser relatados acima divergem também de Patrocínio e Niccoli-Filho (2000), que utilizando o laser de  $\text{CO}_2$  com potência de 2W, encontraram ao terceiro dia de reparo, delgada pavimentação epitelial, e ao sétimo dia, encontraram revestimento epitelial uniforme e queratinizado nas potências de 2, 7 e 10W, mesmo que a inflamação ainda fosse presente e marcante principalmente nos grupos onde foram utilizadas maiores potências. Romanos *et al.* (1999); Sanders e



Reinisch (2000), com laser CO<sub>2</sub> em modo pulsado também obtiveram pavimentação epitelial em maior parte de seus espécimes ao terceiro dia e ao sétimo dia todos os espécimes de laser pulsado e metade dos espécimes de laser contínuo estavam reepitelizados. Watanabe *et al.* (1987); também percebeu reepitelização ao quinto dia em feridas a laser. Portanto, é imprescindível verificar os parâmetro dos lasers utilizados, bem como as condições do estudo como refrigeração do tecido, extensão e profundidade e localização da ferida, para poder ser avaliado a possibilidade de aceleração do processo de cicatrização.

Acredita-se que este retardo no reparo e na formação do epitélio de feridas a laser, relatado pela literatura se deve ao uso de potências muito elevadas. Embora alguns trabalhos como o de Raldi *et al.* (1999) que com potências superiores àquela por nós utilizada (5W, 10W e 15W), observaram proliferação epitelial a partir do quarto dia de pós-operatório, se completando ao décimo quarto dia. Para estes pesquisadores, o reparo das incisões com laser de CO<sub>2</sub> com potências até 10W são clinicamente semelhantes às realizadas por bisturi convencional. Este padrão de reparo é considerado excelente, principalmente levando em consideração às potências altas que foram usadas. Isto se deve provavelmente por ter sido considerado sinais muito precoces de formação do epitélio, sendo que neste trabalho, só considerou-se o revestimento epitelial quando este encontrava-se completo.

Romanos *et al.* (1999) acreditaram que o retardo inicial do reparo se dá pelo atraso na formação do epitélio e atribui este fenômeno a substâncias inibitórias liberadas pelos tecidos necróticos e até mesmo a barreira física causada pela crosta, embora pode-se considerar a crosta como proteção de agentes externos, favorecendo no reparo. Porém acredita-se que no reparo de feridas a laser não há atraso no início da

proliferação celular para formação do novo epitélio, pois esta reepitelização se inicia seis horas após a agressão, independente do método cirúrgico utilizado como mencionam Brugnera Júnior e Pinheiro (1998).

Concorda-se com Patrocínio e Niccoli-Filho (2000) no que se refere a utilização de altas potências gerando grande quantidade de tecido carbonizado e demora na reabsorção deste tecido, bem como interferindo na formação de tecido de granulação e na atividade fibroblástica. Por este motivo utilizou-se a laserterapia com o intuito de amenizar a agressão sofrida pelos tecidos vizinhos. Assim, com o estímulo do laser, os Fibroblastos teriam a energia necessária para multiplicação ou aumento de seu metabolismo, através de modificações estruturais destas células, como já mencionado anteriormente por Chomette *et al.* (1991).

No estudo de Benarska *et al.* (1998) encontrou-se um efeito extremamente positivo com laserterapia de  $\lambda 670\text{nm}$  em fibroblastos humanos. Porém, é fundamental levar em consideração o fato de que este estudo foi realizado em culturas de células, e apesar do grande valor científico dos estudos *in vitro*, em cultura de células, a diferença de parâmetros não permite comparação com resultados de estudos *in vivo*. Benarska *et al.* acreditam que o efeito biomodulador da laserterapia no comprimento de onda vermelho, leva a proliferação e diferenciação fibroblástica em longo prazo. Em seu estudo, houve aumento da cultura de Fibroblastos humanos após uma hora da aplicação do laser vermelho e entre três e cinco dias após a laserterapia. Os autores atribuem este resultado ao incremento da atividade enzimática mitocondrial e em consequência da aumentada produção de ATP. Estes resultados corroboram com o estudo de Karú, em 1995.

Existem considerações importantes para se obter bons resultados com a laserterapia como o tratamento prévio do tecido a ser irradiado como mencionado por Walker *et al.* (2000), onde a exposição do tecido aos raios gama causou prejuízo a proliferação celular, onde, mesmo com a laserterapia de  $\lambda 660\text{nm}$  não foi suficiente para o aumento das células fibroblástica. A eficácia de qualquer recurso depende de sua indicação pertinente e sua correta utilização, e para tanto é necessário o conhecimento de todas as variáveis que estão envolvidas no processo.

Assim como Campanha (2002), Chomette *et al.* (1991) também evidenciaram aumento de deposição de colágeno com a laserterapia, estes últimos também relacionam o aumento na síntese de colágeno encontrado em seu estudo aos Fibroblastos com características ultra-estruturais diferentes daqueles Fibroblastos encontrados em feridas feitas com bisturi. Neste presente estudo, evidenciou-se o aumento de deposição colagênica nos subgrupos tratados com laserterapia, independente do recurso utilizado na cirurgia e da concentração de fibroblastos evidenciada. Isto pode indicar que o efeito biomodulador, não só pode estimular a divisão e proliferação celular, como também incrementa a atividade metabólica celular, na produção de matriz extra-celular, sobretudo do colágeno, proporcionando uma melhor qualidade do reparo.

Encontrou-se diferença significativa apenas na análise imunocitoquímica de fibroblastos, indicando que no grupo controle houve maior evidência de fibroblastos quando comparada com grupos experimental de excisão a laser seguido de laserterapia de  $\lambda 830\text{nm}$ , confirmando Kreisler *et al.* (2002) com a afirmativa de que melhor espectro

de absorção para os fibroblastos varia entre  $\lambda 800\text{nm}$  e  $\lambda 830\text{nm}$ . Embora isto não tenha afetado na produção de colágeno, o que reafirma mais uma vez a idéia de modificações ultraestruturais dos fibroblastos com o uso de laserterapia. Também vale salientar que a maior quantidade de Fibroblastos e conseqüentemente de colágeno, de maneira desorganizada, pode acarretar a formação da indesejada de cicatriz fibrosa como ressalta Akasaka *et al.* (2004); Webb e Dyson (2003); Freitas (2000); Freitas *et al.*(2002). Nas observações histológicas da atual pesquisa, pela técnica do Picrosírius, verificou-se ao final do reparo que, nos grupos experimentais (que receberam laserterapia) não houve necessariamente um aumento quantitativo de Colágeno, mas sim sua maior maturação e melhor organização das fibras, paralelas a superfície, muito semelhante à derme adjacente. Isto pode ser um indicativo de que a laserterapia favorece um reparo de melhor qualidade e maior resistência tensional, evitando a formação de cicatriz fibrosa, como mencionado acima, estando de acordo Utley *et al.* (1999); Sanders e Reinisch (2000).

Apesar de não ser identificado diferença significativa na produção de colágeno entre os subgrupos estudados, pode-se observar ao exame microscópico um melhor arranjo das fibras colágenas, favorecendo a remodelação dos reparos principalmente a partir do sétimo dia. Esta evidencia está de acordo com os resultados encontrados por MEDRADO *et al.*, (2003). Reddy *et al.* (1998) explicaram este fenômeno devido a diferença estatística das ligações cruzadas entre as fibrilas após a laserterapia, o que torna as fibras colágenas mais estáveis e melhor organizadas. Os feixes de fibras colagênicas mostraram-se mais maduros e com organização paralela à superfície, sugestivo de uma maior resistência à ferida recém reparada.

Em se tratando de deposição de colágeno em feridas realizadas com laser de  $\text{CO}_2$ , os presentes achados corroboram vários trabalhos, no que diz respeito a distribuição frouxa e delgadas fibras colágenas (WATANABE *et al.* 1987; ANDRADE, 1999). Mas já ao quinto dia, os autores relatam uma maior organização dos feixes que se mostram mais maduros, bem como outras características histológicas como infiltrado inflamatório crônico e reepitelização, evidencias estas só observadas no oitavo dia de

nosso estudo. Apesar de não ser observado maior deposição de colágeno nos grupos operados com laser de CO<sub>2</sub> em comparação com os grupos excisados com bisturi, houve maior deposição colagênica dos grupos excisados com laser seguidos de laserterapia nas observações de três e oito dias (subgrupos 5A, 6A, 5B e 6B), quando comparados com seu respectivo controle (subgrupos 4A e 4B). Já no tempo de quatorze dias, observou-se maior maturação e organização nos feixes colagênicos dos espécimes tratados com laserterapia, independente do comprimento de onda. Pode-se observar nos subgrupos que receberam laserterapia a disposição dos feixes colagênicos deixando mais precocemente o padrão imaturo, de organização frouxa como mencionou Andrade (1999) e se dispendo de forma paralela à superfície, oferecendo maior resistência a lesão recém regenerada.

Na análise da imunomarcação pela  $\alpha$ -Actina, com o intuito de evidenciar os Miofibroblastos, observou-se nesta pesquisa que quanto mais marcante o processo inflamatório, menos freqüente foram estas células. Esta observação coincide com estudo de Sobral *et al.*, (2004). Os autores mencionam que a presença do componente inflamatório, principalmente infiltrado macrofágico, tem ação inibitória na síntese de TGF $\beta$ 1, fator importante na migração e proliferação de Fibroblastos. Assim, em áreas de grande inflamação, houve menor deposição de colágeno e menor freqüência de miofibroblastos. Zeinoun *et al.* (2001) também confirmam este achado, complementando que na presença de tecido de granulação jovem, os fibroblastos se expressam pobremente pela Vimentina. Embora já se sabe que tecidos irradiados tenham elevação de seus níveis de fatores de crescimento, sendo o TGF $\beta$  um dos mais decisivos no aumento de fibroblastos (YU *et al.*, 1997).

Corroboramos com os dados obtidos no estudo de Freitas (2000) e Cornelissen *et al.* (2000); Campanha (2002) no tocante a concentração de Miofibroblastos, onde foi

precocemente evidenciado no terceiro dia e teve seu pico no oitavo dia; porém ao décimo quarto dia não houve diferença entre feridas a laser e convencionais. Estes dados deferem daqueles apresentados por Zeinoun *et al.* (2001) que encontraram pico máximo de Miofibroblastos já no terceiro dia.

A laserterapia eleva as taxas de ATP mitocondrial e por conseqüência aumento do metabolismo celular e produção de aminoácidos e proteínas (KARU, 1987; KARU *et al.*, 1994; AL-WATBAN *et al.*; 2000). No presente estudo observou-se maior maturação de colágeno com a utilização de baixas doses de energias do laser concordando como no estudo de Pugliese *et al.* (2003); Mendez (2002); Sanders e Reinisch (2000); Tang *et al.*, (1998).

Mendez (2002) além de averiguar a influência de várias doses de energia, obtendo melhores resultados com doses menores, também avaliou o efeito de espectros de onda de luz laser diferentes e percebeu que a associação de dois comprimentos de onda de diferentes espectros foi vantajosa no intuito de aumento na produção de colágeno. Este fenômeno se explica pelo fato de que comprimentos de onda variados têm diferentes níveis de penetração em cada tipos de tecido biológico. Assim, os menores comprimentos de onda, do espectro vermelho, possuem penetração muito superficial, enquanto os comprimentos de onda do espectro infravermelho tem ação nos planos mais profundos (KOLÁROVÁ *et al.* (1999). Neste estudo foi observado de uma forma geral, melhores resultados nos espécimes irradiados com laser de  $\lambda$  de 830nm, e principalmente nos subgrupos operados com laser de CO<sub>2</sub>. Este fato leva a crer que em reparos de feridas de excisionais onde há perda maior de tecido, é mais conveniente estimular os tecidos mais profundo com comprimentos de onda maiores. Os laseres de

menor comprimento não vão além das camadas extremamente superficiais, epiderme e, estruturas teciduais da superfície que, se encontrando degeneradas, não vão responder a este estímulo do laser.

Também Reddy *et al.* (2001) encontraram aumento de colágeno utilizando  $\lambda 632,8\text{nm}$  em ratos diabéticos, porém, utilizando controle contralateral. Embora os autores terem realizado estudos prévios que mostraram não haver interferência entre os grupos com o uso de controle contralateral, acredita-se que o efeito sistêmico relatado por vários estudos consagrados levaria a distorção dos resultados.

Assim como nestes resultados Loumanen *et al.* (1988); Rubin e Faber, (1990); Chomette *et al.* (1991) também encontram miofibroblastos mais presentes em reparos de feridas com bisturi, em tempos precoces de reparo. Ao oitavo dia o grupo de bisturi sem laserterapia, apresentou maior concentração de Miofibroblastos, como nos resultados apresentados por Cornelissen *et al.* (2000). Na análise de quatorze dias, não foi encontrado variação considerável entre os grupos. O retardo da cicatrização de feridas a laser também podem ter como coadjuvante a diminuição ou ausência de miofibroblastos, já que estas células têm ação de contração e faz com que as bordas das feridas se unam mais rapidamente. Apesar disto estes autores ainda mencionem neste trabalho que a reepitelização iniciou-se antes mesmo do surgimento de miofibroblastos.

Considera-se oportuna à realização de outros estudos com várias potências do laser de  $\text{CO}_2$ , sendo com pequenas variações entre elas, bem como intervalos de observação pequenos. Assim torna-se possível determinar a que potência máxima

poderia ser usada com o menor dano térmico e maior capacidade de reparo e melhor qualidade da cicatriz.

É necessário à realização de mais estudos pautados em condições mais próximas das condições clínicas, utilizando modelos animais, identificando e controlando variáveis determinantes. Condições *in vivo* são difíceis de serem reproduzidas em estudos *in vitro*, pois se corre o risco de se negligenciar inúmeros fatores de interferência, podendo caracterizar viés de estudo, oferecendo dados duvidosos. A ação dos lasers em processos celulares já é consagrada pelos estudiosos da área, porém ainda é considerado necessário avaliar as combinações dos inúmeros fatores que envolvem a laserterapia e controlar as muitas variáveis para que se reproduzam situações clínicas em humanos com mais fidedignidade. Assim, conhecendo melhor a ação do laser, pode-se combinar seus parâmetros com base científica, visando obter resultados precisos, uma maior aplicabilidade e maior eficiência, desta forma conquistando este valioso recurso a favor do profissional e do paciente.



## CONCLUSÃO

A laserterapia tem efeito positivo no processo de reparo de feridas excisionais nos dois métodos cirúrgicos utilizados.

Observou-se formação precoce do revestimento epitelial da ferida cirúrgica após laserterapia;

Encontrou-se maior maturação e organização das fibras colágenas;

Ocorreu aceleração da fase inflamatória presente nos processos de reparo de feridas;

Menor formação de edema, após tratamento com Laser, também foi encontrado;

Em feridas realizadas com laser de CO<sub>2</sub>, ocorreu menor concentração de miofibroblastos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEGBOYEGA, P. A.; MIFFLIN, R. C.; DIMARI, J. F. *et al.* Immunohistochemical study of myofibroblasts in normal colonic mucosa, hyperplastic polyps, and adenomatous colorectal polyps. **Arch. Pathol. Lab. Med.** V. 126, July. 2002.

AL-WATBAN, F. A. H.; ANDRES, B. L.; ZHANG, X. Wound healing efficacy of hene laser (632.8nm) and pharmacological treatments in normal rats. **Laser Life Sci.** V. 9, p. 245-254. 2000.

AL-WATBAN, F. A. H.; ZHANG, X, Y. The acceleration of wound Healing is not attributed to laser skin transmission. **Journal of laser Therapy**, v. 11-1, Mar. 2001.

AKASAKA, Y.; ONO, I.; YAMASHITA, T.; JIMBOW, K. *et al.* Basic fibroblast growth factor promotes apoptosis and supresses granulation tissue formation in acute incisional wounds (2004)

ANDRADE, Z. A. Tecido conjuntivo, reparo, regeneração e cicatrização. In: MONTENEGRO, M. R.; FRANCO, M. **Patologia: Processos Gerais**, 4 ed. São Paulo: Atheneu, 1999. Cap. 8135-151.

BADID, C.; MOUNIER, N.; COSTA, A. M. A.; *et al.* Role of myofibroblastos during normal tissue repair and excessive scarring: interest of their assesment in nephropathies. **Histol. Histopathol.** Murcia, v. 15, p. 269-270, 2000.

BEDNARSKA, K.; ROZGA, B.; KOLODZIEJCZYK, K.; SZOSLAND, D.; LEYKO, W.; BRYSEWSKA, M. Effect of low-power red light laser irradiation on the viability of human skin fibroblast. **Radiat. Environ Biophys** v. 37, p. 215-217, 1998.

BISHT, D.; MEHROTRA, R.; SINGH, P.A.; ATRI, S. C.; KUMAR, A. Effect of helium-neon laser on wound healing. **J. Exp. Biol.** v. 37, Feb., 187-189, 1999.

BOENISH, T. **Immunochemical Staining Methods**. Carpinteria, CA: Dako Corporation; 1989.

BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo: Patologia Geral**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2 ed. 1998.

BRUGNERA JÚNIOR, A.; PINHEIRO, A. L. B. **Laser na Odontologia Moderna**. São Paulo: Pancast, 1998, 356p.

BRUGNERA JÚNIOR, A.; VILLLA, R. G.; GENOVESE, W. G. **Laser na Odontologia**. São Paulo: Pancast, 1991. 61p.

CAMPANHA, B. P. **Luz polarizada ( $\lambda$ 400-2000nm) e laser não-ablativo ( $\lambda$ 685): Descrição do processo de reparo em feridas, através de avaliação morfológica e imunocitoquímica**. Tese de Mestrado PUCRS, Porto Alegre, 2002.

CHOMETTE, G.; AURIOL, M.; LABROUSSE, F.; et al. Influence du rayonnement laser de CO<sub>2</sub> sur les modalités morphologiques de la cicatrisation cutanéomuqueuse en chirurgie stomatologique. **Rev. Stomatol. Chir. Maxillof.**, Paris, V. 92, n. 1, p. 1-7, 1991.

CORNELISSEN, A. M. H.; STOOP, R.; HOFF, H. W. V.; et al. Myofibroblasts and matrix components in healing palatal wounds in the rat. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhag, v. 29, p-1-7, 2000.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; TUCKER, C. Reparo dos tecidos: Crescimento celular, fibrose e cicatrização de feridas in; COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; TUCKER, C. **Patologia estrutural e funcional**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2000. Cap. 4:. Pag. 79-100.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. Reparo dos tecidos: crescimento celular, fibrose e cicatrização de feridas. In: \_\_\_\_\_. **Robbins: Patologia estrutural e funcional**.

EDVARD, L.; NAMMOUR, S.; DOUROV, N. Scanning electron microscopic and immunocytochemical studies of contraction during secondary CO<sub>2</sub> laser wound healing rat tongue mucosa. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhag, v. 25, n.2, p. 72-75, June, 1996.

FISHER, S. E.; FRAME, R. M.; BROWNE, R. M. A comparative histological study of wound healing following CO<sub>2</sub> laser and conventional surgical excision of canine buccal mucosa. **Archs. Oral Biol.**, Oxford, v. 28, n. 4, p 287-91. 1983.

FRAME, J. W. Treatment of sublingual keratosis with the CO<sub>2</sub> laser. **Br. Dent. J.** , London, v. 156, n. 7, p. 243-246. Apr., 1984.

FREITAS, A. C. **Avaliação do efeito antiinflamatório do laser diodo infravermelho de 830nm através da monitorização da proteína C-reativa.** Recife, 1998. 74p Dissertação (Mestrado em Odontologia, área de concentração em cirurgia e traumatologia Bucomaxilofacial) Departamento de prótese e cirurgia Buco-facial da Universidade Federal de Pernambuco, 1998.

FREITAS, A. C. **Avaliação da presença de miofibroblastos no processo de reparo em feridas cirúrgicas realizadas com laser de CO<sub>2</sub> e bisturi convencional.** Porto Alegre, 2000, 115p. Dissertação (Doutorado em Odontologia, área de concentração em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial) Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica de Rio Grande do Sul, Porto Alegre 2000.

FREITAS, André Carlos de, PINHEIRO, A. L. B., OLIVEIRA, Marília Gerardt de, RAMALHO, Luciana Maria Pedreira. Assessment of the Behavior of Myofibroblasts on Scalpel and CO<sub>2</sub> Laser Wounds; An Immunohistochemical Study in Rats. **J Clin Laser Med & Surg.** Mary Ann Liebert: , v.20, n.4, p.221 - 225, 2002.

FULTON, J. E.; SHITABATA, P.K. CO<sub>2</sub> Laser physics and tissue interactions in skin. **Laser surg med** V. 24, p. 113-121, 1999.

HOWARD, J.; ARANGO, P.; OSSOFF J.; OSSOFF, R. H.; REINISCH, L. Healing of laser incisions in rat dermis: Comparisons of the carbon dioxide laser under manual and computer control and the scalpel. **Laser surg med** 1997, 20:90-96.

HUNT, T. K. Basic principles of wound healing. **J. trauma**, San Francisco, v. 30, n. 12 (Suppl.), p. 122-128, dec 1990.

JOHNSON, M. A., *et al.* Comparison of CO2 laser, eletrocautery, and scalp incisioins on acute-phse reactans in rat skin. **The American Surgeion**, v. 63, n. 1, p. 13-16, Jan. 1997.

KARU, T. I. et al. Photobiologicals fundaments of low-power laser therapy. **J. Quant. Elect.** V. QE23, n. 10, p. 1703-1717, Oct. 1987.

KARU, T. I., PYATIBRAT, L.; KALENDO, G. Irradiation with He-Ne laser increases ATP level in cells cultivated in vitro. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.** V. 27, p. 219-223, 1995

KOOPMANN, C. Cutaneus wound healing. **Otolaryngol. Clin. North. Am.**, Philadelphia, v. 28, n. 5, p. 835-845, 1995.

KREISLER, M.; CHRISTOFFERS, A. B.; AL-HAJ, H.; WILLERSHAUSEN, B.; d'HOEDT, B. Low Level 809nm Diode laser-induced in vitro stimulation of the proliferation of human gingival fibroblasts. **Lasers Surg Med** , 2002, 30:365-369.

KOLÁROVÁ, H.; DITRICOVÁ, D.; WAGNER, J. Penetration of the laser light into the skin in vitro. **Laser Surg Med.**, 1999, 24:231-235.

LILGE, L.; TIERNEY, K.; NUSSBAUM, E. Low-level laser therapy for wound healing feasibility of dressing translumination. **J Clin Laser Med Surg.** V. 18, N. 5, p: 235-240. 2000.

LOPES, L. A. BRUGNERA JÚNIOR, A. Aplicações clínicas do laser não-cirúrgico. *In:* BRUGNERA JÚNIOR; A. e PINHEIRO, A. L. B. P. **Laser na Odontologia Moderna.** 1998 São Paulo, Pancast. C. VI, p. 99-120.

LUOMANEN, M.; VIRTANEN, I. Healing of laser and scalpel wounds of rat tongue mucosa as studied with cytokeratin antibodies. **J. Oral Pathol. Med** 1987; 16: 139-44.

LUOMANEN, M.; MEURMAN, J. H.; LETHO, V. P. Extracellular matrix in healing CO2 incision wound. **J Oral Pathol Med** 1987; 16: 322-31.

LUOMANEN, M.; VITARNEN, I. Fibronectins in healing incision, excision and laser wounds. **J Oral Pathol Med** 1991; 20: 133-8.

LUOMANEN, M. Processo decicatrização nas cirurgias a laser. *In:* BRUGNERA JÚNIOR; A. e PINHEIRO, A. L. B. P. **Laser na Odontologia Moderna.** 1998 São Paulo, Pancast. C. XIII, p. 221-232.

MARTINEZ-HERNANDEZ, A. Reparação, regeneração e fibrose. In: RUBIN, E.; FARBER, J. L. **Patologia**. Rio de Janeiro: Interlivros, 1990. cap. 3, p. 60-86.

MEDRADO, A. R. A. P.; PUGLIESE, L. S.; REIS, S. R. A.; ANDRADE, Z. A. Influence of low level laser therapy on wound healing and its biological action upon myofibroblasts. **Lasers Surg Med.**, 2003; 32: 239-244.

MENDEZ, TATIANA M. T. VERA; **Avaliação da influência da dose e do comprimento de onda no processo de reparo subcutâneo de feridas submetidas a laserterapia**. Dissertação de Mestrado São José dos Campos, SP 2002.

MONTENEGRO, M. R.; FRANCO, M. **Patologia, processos gerais**. São Paulo: Atheneu, 1999. Cap. 8, p 135-151.

NASCIMENTO, P. M. **Efeito da variação da intensidade e do comprimento de onda do laser não cirúrgico em feridas cirúrgicas em dorso de ratos: Estudo Histológico**. São José dos Campos, SP, 2001. 69p Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica, do programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade do Vale do Paraíba).

NICCOLI-FILHO, W.; SERAIDARIAM, P. I.; NEISSER, M. P.; *et al.* Vestibuloplastia em maxila com laser de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>): Relato de um caso. **JBC**, v. 2, n. 12, p. 53-54 , 1998.



OLIVEIRA, R. A. P. **Efeitos da fototerapia na cicatrização de feridas cirúrgicas produzidas com o laser de CO<sub>2</sub>**. Porto Alegre, 2002 155p. Dissertação (Doutorado em Odontologia, área de concentração em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial) Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica de Rio Grande do Sul, Porto Alegre 2002.

PATROCINIO, M. C.; NICCOLI-FILHO, W. Efeitos da radiação laser de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) na mucosa de revestimento bucal: estudo histológico em ratos. **Pós-grad. Rev. Fac. Odontol. São José dos Campos**, v. 3, n. 2, jul./dez. 2000.

PAYNE, B. P.; NISHIOKA, N. S.; MIKIC, B. B.; VENUGOPALAN. Comparason of pulsado CO<sub>2</sub> Laser ablation at 10.6µm and 9.5 µm. **Lasers Surg Med** V. 23, p. 1-6, 1998.

PIMENTA, L. H. M. **Laser em Medicina e biologia**. São Paulo: Rocca, 1990, v. 1, 85p. In: VARANDAS, E. T.; GENOVESE, W. J. O uso do laser de CO<sub>2</sub> em cirurgia bucal. **Rev. ABO**, São Paulo, V. 8, n. 2, Abr./Maio, 2000.

PINHEIRO, A. L. B.; FRAME, J. W. O uso to CO<sub>2</sub> laser no tratamento de lesões de tecidos moles na cavidade oral. **Rev. Bras. Med.** 1991b; 48: 163-70, 1991.

PINHEIRO, A. B. P. **Comparasion of tissue damage and healing in scalpel and CO<sub>2</sub> Laser mucosa wounds**. PhD Thesis. University of Birmingham. 529 p. 1993.

PINHEIRO, A. B. P.; FREITAS, A. C.; PONZI, E. A. C. O. Uso do laser no tratamento de lesões pré-malignas e malignas da cavidade bucal. **Anais da Faculdade de Odontologia da UFPE**, Recife, v. 8, n. 1, 1997.

PINHEIRO, A. L. B. P. Interação tecidual. In: BRUGNERA JÚNIOR; A. e PINHEIRO, A. L. B. P. **Laser na Odontologia Moderna**. 1998 São Paulo, Pancast. C. III, p. 45-62.

PINHEIRO, A. L. B. P. **Os raios laser de CO<sub>2</sub> e sua utilização em cirurgia Odontológica e Maxilo-facila: Revista da literatura e sugestões para normas de segurança**. Monografia de Especialização em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial. Camarajibe-PE. Faculdade de Odontologia de Pernambuco, 1998.

RALDI, F. V.; NICCOLI-FILHO, W.; PRAKKI, P. Estudo clínico comparativo entre reparo após sutura convencional e incisão á laser de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) com diferentes potências. **Pós-grad. Rev. Odontol. São José dos Campos**, v. 2, n. 1, Jan./Jun. 1999.

REDDY, G. K.; STEHNO-BITTEL, L.; ENWEMEKA, C. S. Laser photostimulation of collagen production in healing rabbit Achilles tendons. **Lasers Surg Med**. V. 22, p. 281-287, 1998.

REDDY, G. K; STEHNO-BITTEL, L.; ENWEMEKA, C. S. Laser photostimulation accelerates wound healing in diabetc rats. **Wound Rep Reg**. May-June, V. 9, n. 3, p. 248-255. 2001.

REINISCH, L. Laser physics and tissue interactions. **Otolaryngol. Clin. N. America.** New York, v. 29, n. 6, p. 893-914, Dec. 1996.

RIGAU I MAS, J. Bioenergia e propriedades ópticas dos tecidos. In: BRUGNERA JÚNIOR; A. e PINHEIRO, A. L. B. P. **Laser na Odontologia Moderna.** 1998 São Paulo, Pancast. C. IV, p. 63-78.

ROMANOS, G.; SIAR, C. H.; TOH, G. C. A preliminary study of healing of superpulsed carbon dioxide laser incisions in the hard palate of monkeys. **Lasers Surg Med.** V. 24, p. 368-374, 1999.

RUBIN, E.; FABER, J. L. **Patologia Rubin Faber.** Rio de Janeiro: Interlivros, 1990. P. 70-86.

SANDERS, D. L., REINISCH, L. Wound Healing and collagen thermal damage in 7.5- $\mu$ sec pulsed CO<sub>2</sub> laser skin incisions. **Lasers Surg Med,** n. 26, p. 22-32, 2000.

SCHLAGER; A. KRONBERGER, P.; PETSCHKE, F.; ULMER H. Low-power laser light in the healing of wavelenghts (635nm and 690nm) and a placebo group. **Lasers Surg Med,** n. 27, p. 39-42, 2000.

SHARPLAN 20 C. **CO<sub>2</sub> Surgical Laser System: user's manual.** Israel: Sharplan Laser, Ins. 1995.

SHAFER, W. G.; HINE, M. K.; LEVY, B. M. : Cicatrização de feridas bucais. In: SHAFER, W. G.; HINE, M. K.; LEVY, B. M. **Tratado de patologia bucal**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 4 Ed. 1987. Cap. 11, Pgs 549-67.

SINHA, U. K.; GALLAGHER, L. A. Effects of steel scalpel, ultrasonic scalpel, CO2 Laser, and monopolar and bipolar electrocautery on wound healing in guinea pig oral mucosa. **Laryngoscope**, Philadelphia. feb., v. 113, p. 228-236, 2003.

TANG, J.; O'CALLAGHAN, D.; ROUY, S.; GODLEWSKI, G. Quantitative changes in collagen levels following 830-nm diode laser welding. **Lasers Surg Med** 22: 207-211, 1998.

UTLEY, D. S.; KOCH, R. J. EGBERT, B. M. Histologic analysis of the thermal effect on epidermal and dermal structures following treatment with the superpulsed CO2 laser and the Erbium:Yag laser: An in vivo study. **Lasers Surg Med** V. 24, p. 93-102. 1999.

WALKER, M. D.; RUMPF, S.; BAXTER, G. D. et al. Effect of low-intensity Laser Irradiation (660nm) on a radiation-impaired wound-healing model in murine skin. **Lasers Surg Med** V. 26, p. 47-7. 2000.

WATANABLE, L.; LOPES, R. A.; LIBERTI, E. A. *et al.* Estudo ao microscópico eletrônico de transmissão na cicatrização de feridas produzidas pelo laser de CO<sub>2</sub> no palato de ratos. **Acta. Cirurg.** São Paulo, v. 4, p. 108-112, 1987.

WEBB, C.; DYSON, M. The effect of 880nm low level laser energy on human fibroblast cell numbers: a possible role in hypertrophic wound healing. **J. Photochem. Photobiol. B: Biology**, V. 70, p. 39-44, 2003

YU W.; NAIM, J. O.; LANZAFAME, R. J. Effects of photostimulation on wound healing in diabetic mice. **Lasers Surg Med**, v. 20, p. 56-63. 1997.

ZEINOUM, T.; NAMMOUR, S.; DOUROV, N. et al. Myofibroblasts in healing laser excision wounds. **Lasers Surg Med** V. 28, 74-79, 2001.

**ANEXO 1****APROVAÇÃO NA COMISSÃO INTERNA DE ÉTICA DA FOUFBA**

## ANEXO 2

### COLORAÇÃO DE PICROSÍRIUS

Solução de Sírius Red

Água destilada .....1ml

Ácido pícrico saturado

Sírius Red .....0,1g

#### Preparo da solução

Adicionar o ácido pícrico a água destilada até saturar. Em seguida, acrescentar 0,1g de sírius red sob agitação.

Solução Light Green

Light Green .....0,1g

Água destilada .....100ml

### TÉCNICA DE COLORAÇÃO

1. Desparafinizar os cortes histológicos com imersão em xilol
2. Hidratar os cortes com álcool absoluto, seguido de álcool à 80%, álcool à 70% e por fim água destilada.

3. Corar em solução de sírius Red por 30 minutos

Contracorar em solução de Light Green por 5 minutos

Lavar rapidamente em água corrente

Desidratar

Clarificar

Montar em lamínulas com bálsamo do Canadá

RESULTADO: Fibras colágenas em vermelho e fundo esverdeado

*FONTE: Laboratório do departamento de Patologia do Hospital Universitário Professor  
Edgar Santos da Universidade Federal da Bahia*

## APÊNDICE 1

### CRITÉRIOS DE AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E IMUNOCITOQUÍMICA

SCORES	GRADAÇÃO	CARACTERÍSTICAS
0	AUSENTE	Crosta
1	PRESENTE	Presença de epitélio Interface plana

SCORES	GRADUAÇÃO	CARACTERÍSTICAS
0	AUSENTE	Edema
1	LEVE	Neovascularização Fibroplasia (em H&E) Infiltrado inflamatório
2	MODERADO	Deposição de colágeno (visto em picrosírius)
3	INTENSO	Proliferação fibroblástica Presença de Miofibroblastos



**QUADRO 3:** Resultados Histológicos (Soares, 2006)

GRUPOS	NATUREZA DA INFLAMAÇÃO		GRAU	INTENSIDADE DA INFLAMAÇÃO	HIPEREMIA	EDEMA	NOVOS VASOS	FIBROPLASIA	COLÁGENO	FIBROBLASTOS	MIOFIBROBLASTOS
	N			N	N	N	N	N	N	N	N
1	agudo	2	AUSENTE	0	1	6	0	0	0	0	3
	misto	1	LEVE	6	5	1	0	3	4	1	2
	crônico	6	MODER	2	1	1	7	3	2	1	1
				INTENSO	1	2	1	2	3	3	7
	N										
2	agudo	2	AUSENTE	0	0	6	0	0	0	0	4
	misto	1	LEVE	6	5	1	0	3	0	0	2
	crônico	6	MODER	2	1	1	7	3	3	3	2
				INTENSO	1	3	1	2	3	6	6
	N										
3	agudo	1	AUSENTE	0	1	5	0	0	0	0	3
	misto	1	LEVE	6	4	1	0	2	1	0	4
	crônico	7	MODER	2	2	2	6	3	5	2	0
				INTENSO	1	2	1	3	4	3	7
	N										
4	agudo	0	AUSENTE	0	2	3	0	0	0	0	4
	misto	2	LEVE	4	2	3	0	6	4	2	0
	crônico	7	MODER	2	2	2	4	0	2	4	4
				INTENSO	3	3	1	5	3	3	3
	N										
5	agudo	0	AUSENTE	0	1	4	0	0	0	0	3
	misto	3	LEVE	4	2	2	0	4	3	4	4
	crônico	6	MODER	2	3	2	3	2	1	3	1
				INTENSO	2	3	1	6	3	5	2
	N										
6	agudo	1	AUSENTE	0	0	4	0	0	0	0	3
	misto	2	LEVE	3	5	3	0	2	2	5	3
	crônico	6	MODER	2	4	2	4	3	2	3	3
				INTENSO	3	0	0	5	4	5	1





