

**ALINE ROSE CANTARELLI MOROSOLLI**

**REPARAÇÃO TECIDUAL EM LÍNGUA DE HAMSTER  
TRATADA COM BISTURI CONVENCIONAL,  
ELÉTRICO E RADIAÇÃO LASER: ESTUDO CLÍNICO  
E HISTOLÓGICO**

Tese apresentada como parte dos requisitos obrigatórios para obtenção do título de Doutor em Odontologia, área de concentração em Estomatologia Clínica, da Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

**Orientadora: Profa. Dra. Elaine Bauer Veeck**

**Porto Alegre**

**2008**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação ( CIP )

M869r Morosolli, Aline Rose Cantarelli

Reparação tecidual em língua de hamster tratada com bisturi convencional, elétrico e radiação laser: estudo clínico e histológico / Aline Rose Cantarelli Morosolli. – Porto Alegre, 2008.

**141 f. : il.**

**Tese (Doutorado em Odontologia) – Fac. de Odontologia, PUCRS.**

**Orientação: Prof<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> Elaine Bauer Veeck.**

1. Odontologia. 2. Estomatologia Clínica. 3. Língua (Odontologia). 4. Reparo Tecidual (Odontologia). 5. Laser – Odontologia. I. Veeck, Elaine Bauer.

**CDD 617.607**

Ficha Catalográfica elaborada por

Vanessa Pinent

CRB 10/1297

DEDICATÓRIA E AGRADECIMENTOS



## DEDICATÓRIA

A Deus, muito obrigada:

Pela vida...

Por renovar minhas forças, quando as mesmas tornavam-se fracas,  
por mostrar a sua onipotência, quando não mais acreditava na existência da superação humana,  
por sua Luz Divina, quando a noite parecia longa demais e o dia demorando muito a amanhecer...

Obrigada sempre!

*"Na vida não existem soluções. Existem forças em marcha: é preciso criá-las e, então, a elas seguem-se as soluções."*

*Saint-Exupéry*

# AGRADECIMENTOS

## Agradeço de maneira especial:

À minha avó "querida Mãezinha", pelo seu amor incondicional, pela eterna ajuda e por compreender os meus anseios, mesmo sem entender porque eu precisava ir tão longe!

À minha mãe, **Maria Jurema**, pela seu exemplo de fé inabalável e por todos os seus sacrifícios para que eu tivesse a minha formação!

Ao meu pai, **Luíz Fernando**, por sempre acreditar que eu pudesse chegar aqui!

À minha irmã, **Angela**, pela presença e carinho constantes nesta etapa!

À **Profa. Dra. Elaine Bauer Veeck**, minha orientadora. Há alguns anos, ao ser sua aluna na graduação, nesta casa, encontrei a Professora que me ensinou o método. Algum tempo depois, mostívou-me a continuar o que aprendi, então, conheci a Mãe. Hoje, a tenho como Amiga que mostra-me o que realmente preciso saber. As três, a minha infinita admiração, respeito e gratidão!

À **Profa. Dra. Nílza Pereira da Costa**, pela sua participação desde o curso de Extensão Universitária, nesta casa, pelo seu entusiasmo contagiante, por seus sábios e preciosos conselhos e por todas as oportunidades concedidas!

Ao **Prof. Titular Walter Niccolí Filho** pela consultoria, cuja experiência de pesquisador foi decisiva nesta pesquisa, tua participação foi fundamental; minha imensa gratidão pelo teu apoio incondicional, desde o curso de mestrado e durante o todo o curso do doutorado. Tu sabes o quanto foste importante!

À **Profa. Adjunta Mônica Fernandes Gomes**, consultora e amiga, teus conhecimentos, tua generosidade e inestimável colaboração na análise histológica foram e serão para mim sempre um grande presente!

À Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, na pessoa do seu magnífico Reitor Prof. Dr. Joaquim Clotet.

À Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul - FOPUCRS, na pessoa de seu diretor Prof. Marcos Túlio Mazzini de Carvalho, pela oportunidade da realização do curso.

Ao coordenador do Programa de Pós-graduação em Odontologia da FOPUCRS, Prof. Dr. José Antônio Poli de Figueiredo pelo seu profissionalismo e competência demonstrados.

Ao CNPq pelo apoio financeiro desta pesquisa.

À Profa. Dra. Lílíane Soares Yurgel, sua objetividade peculiar a torna uma pessoa ímpar e admirável.

À Profa. Dra. Karen Cherubini, pelos ensinamentos mostrando sempre, além da sua competência, os seus valores humanos.

À Profa. Dra. Fernanda Salum, sempre atenciosa e solícita com sua capacidade de ser simples e clara ao ensinar.

À Profa. Dra. Maria Martha Campos mais que um agradecimento, quero aqui deixar registrado o meu respeito e carinho por tua amizade e que és um exemplo a ser seguido.

Aos demais professores do Programa de Pós-graduação em Odontologia da FOPUCRS Profa. Dra. Salete Maria Pretto, Prof. Dr. João Felíz, Prof. Dr. Eraldo Batista Júnior, Profa. Dra. Denise Cantarelli Machado, Profa. Dra. Maria Emília Engers, Prof. Dr. José Antônio Poli de Figueiredo pela oportunidade de ampliar meus conhecimentos.

Aos colegas do curso de doutorado Carla Girardi, Frederico Sauressig, Juliana Romanini, Nicole Rahde e Tatiana Pinto pessoas maravilhosas, às quais, para sempre farão parte da minha vida, espero que possamos perpetuar nossa amizade.

À amiga Juliana Romanini, já estava escrito que iríamos ter este elo de amizade e afinidade, antes mesmo de nos conhecermos.

Aos colegas que vieram a seguir, **Márcia Fava, Renata e Felipe**, que apesar da pouca convivência, aprendi a admirá-los.

À **Profa. Dra. Maria Antonieta Lopes de Souza** pela sua contribuição e conhecimentos valiosíssimos, os quais enriqueceram esta pesquisa.

Às Professoras da Disciplina de Radiologia da FOPUCRS: **Profa. Dra. Helena Wilhelm de Oliveira, Profa. Dra. Márcia Rejane Brückner, Profa. Dra. Rejane Maria Holderbaum e Profa. Dra. Maria Ivete Rockenbach**, grandes incentivadoras, sempre acolheram-me com o maior carinho.

Às funcionárias do Serviço de Radiologia da FOPUCRS que me fizeram sentir integrada pelo carinho **Ana Rozelaine, Maria Inês e Carolina**.

Ao **Fernando**, secretário do Serviço de Estomatologia do HSL, pela paciência e cordialidade.

Aos funcionários da secretaria do Programa de Pós-graduação da FOPUCRS, **Ana Lúcia, Davinir, Marcos e Carlos** pela atenção e simpatia dispensadas durante o curso.

Aos funcionários da Biblioteca Central da PUCRS pelo atendimento excelente sempre que solicitado.

À **Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - UNESP**, por ter cedido os animais para este experimento.

À **Profa. Dra. Maria das Graças Goulart** pela amizade e colaboração na realização dos estudos da estatística desta pesquisa.

Ao **Prof. Dr. Miguel Angel Salgado** pela clareza de suas explicações na análise histológica.

À **Néia** pelo auxílio e dedicação excepcionais no preparo das lâminas.

À **Vivi** pela amizade, prestatividade e carinho a mim dispensados.

Aos funcionários do Biotério da Faculdade de Odontologia da UNESP, **Lourival e Antônio** pela prontidão e gentileza.

À amiga **Marínice Pilecco**, noto que não tem noção de como me é necessária e indispensável a nossa afinidade, pelo incentivo, confiança e otimismo incondicionais.

Aos amigos **Doroti Fróes de Vargas e Kleber C. de Vargas** pelo carinho imenso, os considero minha segunda família.

Ao **Karlon Fróes de Vargas** por estar sempre presente em todos os momentos que mais precisei, seja do teu carinho, da tua generosidade ou da tua disponibilidade. Tu fazes e para sempre farás parte da minha vida.

À amiga **Lawrenne Ide Kohatsu** pela nossa verdadeira e maravilhosa amizade construída, mesmo que a distância se interponha entre nós, tua presença se faz sentir todos os dias.

A todas aquelas pessoas aqui não mencionadas, mas que indiretamente tenham contribuído para que meu objetivo fosse alcançado.

**Muito Obrigada!**

RESUMO



## RESUMO

A presente pesquisa teve como objetivo avaliar e comparar o processo de reparação tecidual após exérese de lesão, induzida quimicamente por oleato de monoetanolamina 5% (Ethamolin®), em borda lateral de língua de hamster tratada com bisturi convencional, bisturi elétrico, radiação laser de CO<sub>2</sub> e de Nd:YAG. Foram utilizados 80 hamsters, de ambos os sexos, os quais, foram avaliados nos períodos de sete, 14, 21 e 28 dias pós-operatórios por meio das análises clínica, histomorfológica e histomorfométrica das fibras musculares esqueléticas. A análise clínica evidenciou perda tecidual da língua nos grupos estudados. Na análise histomorfológica foi observado que a dinâmica do processo de reparação tecidual foi mais rápida no grupo bisturi convencional do que nos demais grupos. Os dados obtidos a partir da avaliação estatística da histomorfometria das fibras musculares esqueléticas foram submetidos à análise de variância (ANOVA - uma via) e ao teste de Comparações Múltiplas de Tukey, com nível de significância de  $p < 0,05$ , os quais, mostraram que a densidade de fibras musculares esqueléticas neoformadas aumentou no grupo bisturi convencional quando comparado com os grupos bisturi elétrico ( $p < 0,01$ ), radiação laser CO<sub>2</sub> ( $p < 0,001$ ) e radiação laser Nd:YAG ( $p < 0,01$ ), no período de 14 dias; constatou-se, ainda, que houve aumento progressivo da densidade de fibras musculares esqueléticas neoformadas durante a evolução do processo de reparo em todos os grupos estudados e, na comparação entre os grupos radiação laser de Nd:YAG e CO<sub>2</sub>, a organização tecidual foi mais rápida e a vascularização mais intensa, respectivamente.

**Palavras-chave**<sup>1</sup>: Lasers. Dióxido de carbono. Nd:YAG. Processo de reparo.

---

<sup>1</sup> Bireme - Descritores em Ciências da Saúde (DeCS): Disponível em: <http://decs.bvs.br>

ABSTRACT



## ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate and compare the healing process after surgical treatment of chemically induced lesion in the lateral edge of tongue of hamster performed with scalpel, electrocautery, CO<sub>2</sub> and de Nd: YAG lasers radiation. Eighty hamsters of both sexes were used and evaluated at 7, 14, 21 and 28 of postoperative days by clinical, histological and histomorphometric analysis of the skeletal muscle fibers. Clinical analysis showed loss of the morphology of the tongue in all groups. In the histological analysis, it was observed that the dynamics of the healing process was faster in the scalpel group compared with the other groups. The histomorphometric observation of the skeletal muscle fibers were submitted to analysis of Variance (ANOVA - One Way) and Multiple Comparison of Tukey test, with a level of significance at  $p < 0.05$ , which showed that amount of skeletal muscle fibers formed significantly increased in the scalpel group when compared with the electrosurgery group ( $p < 0.01$ ), CO<sub>2</sub> laser radiation group ( $p < 0.001$ ) and Nd: YAG laser radiation group ( $p < 0.01$ ) at the 14th postoperative day. A gradual increase of skeletal muscle fibers formed during the healing process evolution was observed in all groups. Comparing the laser radiation groups, it was possible to conclude that tissue organization pattern and vascularization were faster and more intense in the Nd: YAG laser radiation group, respectively, in relation to the CO<sub>2</sub> laser radiation group.

**Key words<sup>2</sup>:** Lasers. Carbon dioxide. Nd: YAG. Wound healing.

---

<sup>2</sup> MeSH: Medical Subject Headings: Disponível em: [www.nlm.nih.gov/mesh](http://www.nlm.nih.gov/mesh)

## LISTA DE FIGURAS



## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b>	Estrutura do músculo esquelético.....	45
<b>FIGURA 2</b>	Lesão em borda lateral esquerda da língua, 72 horas pós-infiltração de oleato de monoetanolamina 5% (Ethamolin®). Fonte: Elaborado pelo autor (2008).....	69
<b>FIGURA 3</b>	Aspecto clínico dos quatro grupos experimentais imediatamente após exérese da lesão: grupo bisturi convencional <b>(a)</b> ; grupo bisturi elétrico <b>(b)</b> ; grupo radiação laser de CO <sub>2</sub> <b>(c)</b> ; grupo radiação laser de Nd:YAG <b>(d)</b> . Fonte: Elaborado pelo autor (2008).....	70
<b>FIGURA 4</b>	Localização dos campos utilizados para quantificação da densidade de fibras musculares esqueléticas (C1, C2 e C3). Aumento original 50x. Fonte: Elaborado pelo autor (2008).....	74
<b>FIGURA 5</b>	Aspecto clínico da área tratada em língua no período pós-operatório de sete dias dos grupos: BC <b>(a)</b> , BE <b>(b)</b> , CO <sub>2</sub> <b>(c)</b> e Nd:YAG <b>(d)</b> . Fonte: Elaborado pelo autor (2008).....	77
<b>FIGURA 6</b>	Aspecto clínico da área tratada em língua no período pós-operatório de 14 dias dos grupos: BC <b>(a)</b> , BE <b>(b)</b> , CO <sub>2</sub> <b>(c)</b> e Nd:YAG <b>(d)</b> . Fonte: Elaborado pelo autor (2008).....	78

- FIGURA 7** Aspecto clínico da área tratada em língua no período pós-operatório de 21 dias dos grupos: BC **(a)**, BE **(b)**, CO<sub>2</sub> **(c)** e Nd:YAG **(d)**. Fonte: Elaborado pelo autor (2008)..... 79
- FIGURA 8** Aspecto clínico da área tratada em língua no período pós-operatório de 28 dias dos grupos: BC **(a)**, BC **(b)**, CO<sub>2</sub> **(c)** e Nd:YAG **(d)**. Fonte: Elaborado pelo autor (2008)..... 80
- FIGURA 9** Língua normal. Fotomicrografias exibindo imagem transversal de fragmento de língua normal de hamster **(a)**; aspecto do epitélio pavimentoso estratificado ortoqueratinizado da superfície superior ou dorsal **(b)** e inferior ou ventral **(c)**; vasos sanguíneos de grande calibre e feixes nervosos, localizados da região ventral da língua **(d)**. [H.E., aumento original: 50x, 100x e 200x]. Fonte: UNESP/ FOSJC (2008)..... 82
- FIGURA 10** Fotomicrografias exibindo imagem de corte transversal de fragmento de língua com lesão provocada pelo oleato de monoetanolamina (Ethamolin<sup>®</sup>). Substituição de tecido muscular por tecido conjuntivo bem celularizado com intenso infiltrado inflamatório; extensa solução de continuidade e remanescentes de fibras musculares permeadas por tecido conjuntivo **(a)**; extensas áreas de necrose tecidual do tipo coagulação (seta azul) e pigmentos de hemossiderina (setas pretas) na porção mediana do fragmento **(b e c)**. [H.E., aumento original: 100x e 200x]. Fonte: UNESP/ FOSJC (2008)..... 84

**FIGURA 11** Grupo BC. Sete dias pós-operatório. Fotomicrografias exibindo imagem transversal de fragmento de língua tratada com bisturi convencional **(a)**; fibras musculares esqueléticas isoladas permeadas por tecido conjuntivo bem celularizado **(b)**; intensa vascularização na extensão da lâmina própria **(c)**. [H.E., aumento original: 50x, 100x]. Fonte: UNESP/ FOSJC (2008)..... 86

**FIGURA 12** Grupo BE. Sete dias pós-operatório. Fotomicrografias exibindo imagem transversal de fragmento de língua tratada com bisturi elétrico **(a)**; substituição do tecido muscular por tecido conjuntivo frouxo ricamente celularizado e vascularizado **(b)**; atrofia do epitélio inferior **(c)**; fibras musculares em processo de degeneração (\*) **(d)**; extensas áreas de hialinização **(e)**. [H.E., aumento original: 50x, 200x e 400x]. Fonte: UNESP/ FOSJC (2008)..... 87

**FIGURA 13** Grupo CO<sub>2</sub>. Sete dias pós-operatório. Fotomicrografias exibindo imagem transversal de fragmento de língua tratada com radiação laser de CO<sub>2</sub> **(a)**; substituição do tecido muscular por tecido conjuntivo ricamente vascularizado e com severo infiltrado de células inflamatórias **(b)**; superfície ulcerada recoberta por membrana serofibrinosa **(c)**; preservação de feixes nervosos **(d)**; células gigantes multinucleadas, próximas a áreas de pigmento de hemossiderina **(e)** [H.E., aumento original: 50x e 100x, 200x e 400x]. Fonte: UNESP/ FOSJC (2008)..... 89

**FIGURA 14** Grupo Nd:YAG. Sete dias pós-operatório. Fotomicrografias exibindo imagem transversal de fragmento de língua tratada com radiação laser de Nd:YAG **(a)**; superfície ulcerada recoberta por espessa camada de material amorfo de aspecto hialino (\*), associado a colônias bacterianas e células inflamatórias **(b)**; material hialino (\*) permeado por tecido conjuntivo frouxo com intensa vascularização e bem celularizado **(c)**. [H.E., aumento original: 50x e 200x]. Fonte: UNESP/ FOSJC (2008)..... 90

**FIGURA 15** Grupo BC. 14 dias pós-operatório. Fotomicrografias exibindo imagem transversal de fragmento de língua tratada com bisturi convencional **(a)**; fibras musculares neoformadas permeadas por tecido conjuntivo (\*), bem celular e vascularizado **(b)**. [H.E., aumento original: 50x e 200x]. Fonte: UNESP/ FOSJC (2008)..... 92

**FIGURA 16** Grupo BE. 14 dias pós-operatório. Fotomicrografias exibindo imagem transversal da língua tratada com bisturi elétrico **(a)**; área de abscedação **(b)**; intensa desorganização tecidual **(c)**; fibras musculares permeadas por tecido conjuntivo **(d)** e em processo de degeneração (*setas*) **(e)**. [H.E., aumento original: 50x, 100x e 200x].Fonte: UNESP/ FOSJC (2008)..... 93

**FIGURA 17** Grupo CO<sub>2</sub>. 14 dias pós-operatório. Fotomicrografias exibindo imagem transversal de fragmento de língua tratada com radiação laser de CO<sub>2</sub> **(a)**; fibras musculares (*setas*) permeadas por tecido conjuntivo celularizado **(b)** e vascularizado, subjacente à camada hialina **(c)**. [H.E., aumento original: 50x, 100x e 200x]. Fonte: UNESP/ FOSJC (2008)..... 95

- FIGURA 18** Grupo CO<sub>2</sub>. 14 dias pós-operatório. Fotomicrografias exibindo imagem transversal de fragmento de língua tratada com radiação laser de CO<sub>2</sub> **(a)**; fibras musculares neoformadas e atróficas, distribuídas irregularmente **(b)**, fibras musculares remanescentes em processo de degeneração **(c)**; superfície ulcerada recoberta por material amorfo de aspecto hialino, associada a colônias bacterianas e células inflamatórias, epitélio exibindo atipia celular **(d)**. [H.E., aumento original: 50x, 100x e 200x]. Fonte: UNESP/ FOSJC (2008)..... 96
- FIGURA 19** Grupo Nd:YAG. 14 dias pós-operatório. Fotomicrografias exibindo imagem transversal de fragmento de língua tratada com radiação laser de Nd:YAG **(a)**; fibras musculares neoformadas (\*) em permeio de tecido conjuntivo ricamente celular **(b)** fibras musculares em processo de degeneração, localizadas nas adjacências da região da exérese **(c)**. [H.E., aumento original: 50x e 200x]. Fonte: UNESP/ FOSJC (2008)... 97
- FIGURA 20** Grupo BC. 21 dias pós-operatório. Fotomicrografias exibindo alteração da arquitetura morfológica e estrutural da língua **(a)**; desorganização tecidual (\*) **(b)**. [H.E., aumento original: 50x e 200x]. Fonte: UNESP/ FOSJC (2008)..... 99
- FIGURA 21** Grupo BE. 21 dias pós-operatório. Fotomicrografias exibindo alteração da arquitetura morfológica da língua **(a)**; atrofia de feixes musculares (\*), permeados por tecido conjuntivo frouxo e localizados subjacente ao epitélio da superfície superior **(b)**. [H.E., aumento original: 50x e 100x]. Fonte: UNESP/ FOSJC (2008)..... 100

- FIGURA 22** Grupo CO<sub>2</sub>. 21 dias pós-operatório. Fotomicrografias exibindo alteração da arquitetura morfológica da língua após a exérese da lesão com radiação de laser CO<sub>2</sub> **(a)**; fibras musculares atroficas, permeadas por tecido conjuntivo frouxo, direcionando-se da porção mediana para a superfície desta estrutura **(b)**. [H.E., aumento original: 50x e 100x]. Fonte: UNESP/ FOSJC (2008)..... 102
- FIGURA 23** Grupo Nd:YAG. 21 dias pós-operatório. Fotomicrografias exibindo alteração da arquitetura morfológica da língua, após a exérese da lesão com radiação de laser Nd:YAG **(a)**; fibras musculares neoformadas em organização (\*) **(b)**; atipia epitelial (*seta*) exibindo perda de estratificação celular e relação núcleo e citoplasma, bem como pleomorfismo celular em um dos fragmentos de língua **(c)**. [H.E., aumento original: 50x, 100x e 200x]. Fonte: UNESP/ FOSJC (2008)..... 103
- FIGURA 24** Grupo BC. 28 dias pós-operatório. Fotomicrografias exibindo alteração da arquitetura morfológica da língua **(a)**; feixes musculares organizados e presença de tecido conjuntivo fibroso (*setas*) **(b)**. [H.E., aumento original: 50x e 200x]. Fonte: UNESP/ FOSJC (2008)..... 105
- FIGURA 25** Grupo BE. 28 dias pós-operatório. Fotomicrografias exibindo alteração da arquitetura morfológica da língua **(a)**; feixes musculares atroficos, permeados por tecido conjuntivo fibroso (\*) **(b)**. [H.E., aumento original: 50x e 200x]. Fonte: UNESP/ FOSJC (2008)..... 106

**FIGURA 26** Grupo CO<sub>2</sub>. 28 dias pós-operatório. Fotomicrografias exibindo alteração da arquitetura anatômica da língua **(a)**; feixes musculares permeados por tecido conjuntivo bem celularizado **(b)**; fibras musculares esqueléticas, dispostas isoladamente e em feixes (\*), bem como permeadas por tecido conjuntivo **(c)**; fibras musculares neoformadas apresentando núcleos centrais (setas azuis) e hipertrofia de fibras (setas pretas) **(d)**; material hialino (seta), em processo de degradação, localizado subjacente ao epitélio pavimentoso estratificado ortoqueratinizado, circundado por tecido conjuntivo bem celularizado, ricamente vascularizado; feixes musculares apresentando alterações morfológicas (\*) [H.E., aumento original: 50x, 100x, 200x e 400x]. Fonte: UNESP/ FOSJC (2008)..... 108

**FIGURA 27** Grupo Nd:YAG. 28 dias pós-operatório. Fotomicrografias exibindo alteração da arquitetura morfológica da língua, após a exérese da lesão com radiação de laser Nd:YAG **(a)**; fibras musculares esqueléticas, distribuídas isoladamente e permeadas por tecido conjuntivo rico em fibras colágenas na região superficial **(b)**. [H.E., aumento original: 50x e 100x]. Fonte: UNESP/ FOSJC (2008)..... 109

## LISTA DE TABELAS



## LISTA DE TABELAS

- TABELA 1** Análise histomorfométrica da densidade de fibras musculares esqueléticas ( $\mu\text{m}^2$ ) da área subjacente à exérese de lesão quimicamente induzida em borda lateral esquerda de língua de hamster. Valores expressos por média  $\pm$  erro padrão da média. Fonte: Elaborado pelo autor (2008)..... 111
- TABELA 2** Resultados da Análise de Variância (ANOVA) e Teste de Tukey dos dados histomorfométricos dos grupos BC, BE, CO<sub>2</sub> e Nd:YAG nos diferentes períodos de observação. Comparação entre os grupos. Fonte: Elaborado pelo autor (2008)..... 112
- TABELA 3** Resultados da Análise de Variância (ANOVA) e Teste de Tukey dos dados histomorfométricos dos grupos BC, BE, CO<sub>2</sub> e Nd:YAG nos diferentes períodos de observação. Comparação entre os Tempos. Fonte: Elaborado pelo autor (2008)..... 114

## LISTA DE GRÁFICOS



## LISTA DE GRÁFICOS

- GRÁFICO 1** Densidade de fibras musculares esqueléticas ( $\mu\text{m}^2$ ) da área subjacente à exérese da lesão quimicamente induzida em língua de hamster nos grupos BC, BE, CO<sub>2</sub> e Nd:YAG nos diferentes períodos de observação. Comparação entre os grupos. Cada coluna representa a média de cinco animais e as barras verticais os erros padrão da média. Fonte: Elaborado pelo autor (2008)..... 113
- GRÁFICO 2** Densidade de fibras musculares esqueléticas ( $\mu\text{m}^2$ ) da área subjacente à exérese da lesão quimicamente induzida em língua de hamster nos grupos BC, BE, CO<sub>2</sub> e Nd:YAG nos diferentes períodos de observação. Comparação entre os tempos. Cada coluna representa a média de cinco animais e as barras verticais os erros padrão da média. Fonte: Elaborado pelo autor (2008) ..... 115

## LISTA DE ABREVIATURAS



## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

<b>ADP</b>	Adenosina difosfato
<b>ANOVA</b>	Análise de variância
<b>CEBAPE</b>	Centro de Biociências Aplicado a Pacientes com Necessidades Especiais
<b>Cm</b>	Centímetro
<b>°C</b>	Grau centígrado
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono
<b>DE</b>	Densidade de energia
<b>EGF</b>	Fator de crescimento epidermal
<b>et al.</b>	e colaboradores
<b>FGF</b>	Fator de crescimento de fibroblastos
<b>FOSJC</b>	Faculdade de Odontologia Campus de São José dos Campos
<b>G</b>	Grama
<b>HE</b>	Hematoxilina de Harris e Eosina alcoólica
<b>He</b>	Hélio
<b>He-Ne</b>	Hélio-Neônio
<b>Ho:YAG</b>	<i>Holmium: Yttrium-Aluminum-Garnet</i>
<b>Hz</b>	Hertz
<b>IGF</b>	Fator de crescimento semelhante a insulina

<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon- $\gamma$
<b>IL</b>	Interleucina
<b>J</b>	Joule
<b>J/cm<sup>2</sup></b>	Joule por centímetro quadrado
<b>LASER</b>	<i>Light Amplification by Stimulated of Radiation</i> Amplificação da luz por emissão estimulada de radiação
<b>LTs</b>	Leucotrienos
<b>Mg</b>	Miligrama
<b>mg/Kg</b>	Miligrama por quilo de peso
<b>mJ</b>	Milijoules
<b>ml</b>	Mililitro
<b>MMPs</b>	Metaloproteinases da matriz
<b>mm</b>	Milímetro
<b>N<sub>2</sub></b>	Nitrogênio
<b>Nd:YAG</b>	<i>Neodymium: Yttrium-Aluminum-Garnet</i>
<b>NGF</b>	Fator de crescimento neural
<b>Nm</b>	Nanômetro
<b>n<sup>o</sup></b>	Número
<b>P</b>	Potência
<b>PDGF</b>	Fator de crescimento derivado de plaquetas
<b>pH</b>	Potencial de hidrogênio

<b>PUCRS</b>	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
<b>s</b>	Segundo
<b>t</b>	Tempo
<b>TGF-<math>\alpha</math></b>	Fator de crescimento transformador $\alpha$
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Fator de crescimento transformador $\beta$
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de necrose tumoral $\alpha$
<b>™</b>	Trademark
<b>UNESP</b>	Universidade Estadual Paulista
<b>VEGF</b>	Fator de crescimento endotelial vascular
<b>W</b>	Watts
<b>W/cm<sup>2</sup></b>	Watts por centímetro quadrado
<b>x</b>	Vezes
<b><math>\alpha</math></b>	Alfa
<b>%</b>	Porcentagem
<b>®</b>	Marca registrada
<b>&amp;</b>	E
<b>&gt;</b>	Maior
<b>&lt;</b>	Menor
<b><math>\mu\text{m}</math></b>	Micrômetro
<b>m<sup>2</sup></b>	Micrômetros quadrados

## SUMÁRIO



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>34</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>39</b>
<b>2.1 Fibroblasto/ Fibrócito/ Miofibroblasto.....</b>	<b>39</b>
<b>2.2 Colágeno e Fibras Musculares Esqueléticas.....</b>	<b>42</b>
2.2.1 Colágeno.....	42
2.2.2 Fibras Musculares Esqueléticas.....	43
<b>2.3 Reparação Tecidual.....</b>	<b>46</b>
2.3.1 Fases da Reparação Tecidual.....	47
<b>2.4 Radiação LASER.....</b>	<b>54</b>
2.4.1 Lasers de CO <sub>2</sub> e de Nd:YAG.....	57
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>65</b>
<b>3.1 Objetivos Gerais.....</b>	<b>65</b>
<b>3.2 Objetivos Específicos.....</b>	<b>65</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>67</b>
<b>4.1 Aprovação do Projeto de Pesquisa.....</b>	<b>67</b>
<b>4.2 Delineamento da Pesquisa.....</b>	<b>67</b>
	67

<b>4.3 Caracterização da Amostra.....</b>	
<b>4.4 Indução da Lesão em Borda Lateral de Língua.....</b>	<b>68</b>
<b>4.5 Procedimentos Cirúrgicos.....</b>	<b>68</b>
<b>4.6 Períodos de Observação.....</b>	<b>71</b>
<b>4.7 Análise Clínica.....</b>	<b>72</b>
<b>4.8 Análise Histomorfológica e Histomorfométrica.....</b>	<b>72</b>
4.8.1 Preparo dos Espécimes para Análise Histomorfológica e Histomorfométrica.....	72
4.8.2 Análise Histomorfológica.....	72
4.8.3 Análise Histomorfométrica.....	73
<b>4.9 Análise Estatística dos Resultados.....</b>	<b>74</b>
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>76</b>
<b>5.1 Análise Clínica.....</b>	<b>76</b>
5.1.1 Pós-operatório de Sete Dias.....	76
5.1.2 Pós-operatório de 14 Dias.....	77
5.1.3 Pós-operatório de 21 Dias.....	78
5.1.4 Pós-operatório de 28 dias.....	79
<b>5.2 Análise Microscópica.....</b>	<b>81</b>
5.2.1 Língua Normal.....	81
5.2.2 Língua Lesada – Oleato de Monoetanolamina 5%(Ethamolin®)	83

5.2.3 Pós-operatório de Sete Dias.....	85
5.2.4 Pós-operatório de 14 Dias.....	91
5.2.5 Pós-operatório de 21 Dias.....	98
5.2.6 Pós-operatório de 28 Dias.....	104
<b>5.2 Análise Estatística da Histomorfometria.....</b>	<b>110</b>
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>117</b>
<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>126</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>128</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>137</b>

# INTRODUÇÃO



## 1 INTRODUÇÃO

A perda tecidual é restaurada por regeneração ou cicatrização. A regeneração é a reposição de células ou tecido lesado pelo tecido semelhante ao de origem, restabelecendo as suas funções, enquanto que a cicatrização ou reparação se caracteriza pela neoformação do tecido conjuntivo, com substituição das células lesadas e alteração da arquitetura tecidual (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000). Esta, entretanto, resulta em uma satisfatória condição estrutural e funcional, mas não igual àquela anterior ao dano (LI; CHEN; KIRSNER, 2007).

O processo de reparação tecidual normal é considerado um fenômeno fisiológico dinâmico e complexo que compreende uma seqüência regulada de eventos celulares, teciduais e bioquímicos sobrepostos, que iniciam imediatamente após o dano (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006; LI; CHEN; KIRSNER, 2007). Estes eventos possibilitam a base para os mecanismos fundamentais de reparo, entre eles, síntese de matriz extracelular, angiogênese, contração da ferida e epitelização. Os elementos essenciais para que se iniciem estas atividades são as células residentes (células endoteliais, queratinócitos, fibroblastos), leucócitos (neutrófilos, monócitos/macrófagos, linfócitos), assim como mediadores de natureza lipídica (prostaglandinas, leucotrienos, fator de agregação plaquetária) e protéica (citocinas e fatores de crescimento) (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000; HESS; HOWARD; ATTINGER, 2003; ENOCH; LEAPER, 2007).

As respostas teciduais frente a lesões, sejam provocadas cirurgicamente ou por traumatismo, envolvem inflamação, proliferação celular e remodelação (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006). A inflamação é um componente primordial no processo de reparação, pois desencadeia uma série de eventos pelos quais o tecido lesado ou o fator etiológico é eliminado, induzindo a reconstrução e reparação; embora, estes eventos variem de acordo com a causa. Quaisquer alterações que interrompam o tempo certo da reparação do tecido estendem o dano e retardam o processo de reparo (LI; CHEN; KIRSNER, 2007).

Na área da estomatologia, a radiação laser de alta potência, particularmente de Dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), Diodo, Argônio, Érbio:YAG e Neodímio: Ítrio- Alumínio-

Granada (Nd:YAG) têm sido utilizadas para procedimentos cirúrgicos como incisão, vaporização e coagulação, incluindo desde lesões traumáticas até neoplasias benignas, processos proliferativos, lesões linfo-hemangiomas, lesões potencialmente cancerizáveis e casos seletivos de neoplasias malignas (ROMANOS et al., 1999; NICCOLI-FILHO; MOROSOLLI, 2003; MOROSOLLI et al., 2006; DEPPE; HORCH, 2007).

Segundo Niccoli-Filho et al. (1997) e Thuaksuban e Nuntanarant (2003), dentre as vantagens da utilização da radiação laser sobre os métodos convencionais de tratamento, incluem-se mínima destruição celular, redução da dor e edema pós-operatório, campo cirúrgico estéril e exangue, promovendo excelente visualização das estruturas, redução do trauma mecânico. Na grande maioria dos casos, não há a necessidade de sutura e, ainda, a grande aceitação por parte do paciente.

Para Rossmann et al. (1987), Myers, Myers e Stone (1989), Romanos et al. (1995), Frame (2003) e Cantatore e Kriegel (2004) o uso da radiação laser não aumenta a capacidade de reparação das lesões bucais quando comparada com as técnicas cirúrgicas realizadas com bisturi convencional, elétrico ou crioterapia. Entretanto, os autores observaram diminuição do tempo de procedimento cirúrgico e que as aplicações podem ser controladas com precisão, conduzindo a uma menor destruição tecidual, associada à mínima contração da ferida pós-operatória. Estes resultados justificam a utilização da radiação laser, com destaque para os lasers de CO<sub>2</sub> e de Nd:YAG como ferramentas úteis em cirurgias de tecidos moles da cavidade bucal.

Com relação ao uso do bisturi elétrico na incisão e coagulação de tecidos moles, Vasconcellos et al. (2003), Sinha e Gallagher (2003) e Camacho-Alonso e López-Jornet (2007) consideraram algumas vantagens quando comparado à técnica tradicional, desde que respeitadas as precauções e indicações, uma vez que seu uso gera corrente elétrica de alta frequência, quando em contato com o tecido. Dentre as vantagens deste instrumento cirúrgico os autores citaram: diminuição do tempo cirúrgico, depleção do fluxo sanguíneo, tornando o ato cirúrgico exangue e com melhor visibilidade. Entretanto, esta técnica também pode causar complicações, tais como, queimadura elétrica, podendo ocorrer no sítio cirúrgico ou no local do eletrodo, interferência eletromagnética com outros instrumentos no campo cirúrgico, causando deficiência no funcionamento de dispositivos cardíacos implantados ou,

ainda, em implantes cocleares durante sua utilização. Outros autores constataram que quando aplicado em mucosa bucal, pode causar aumento da dor pós-operatória, perda de peso, atraso na reparação e, ainda, produção de fumaça contendo gases tóxicos (SINHA; GALLAGHER, 2003; CAMACHO-ALONSO; LÓPEZ-JORNET, 2007).

Esta pesquisa teve por objetivo avaliar o processo evolutivo da reparação tecidual após tratamentos cirúrgicos realizados pelos métodos convencional, bisturi elétrico e dois tipos de radiação laser, por meio dos aspectos clínicos e da microscopia de luz, utilizando-se a análise da histomorfometria, considerando-se a densidade de fibras musculares esqueléticas presentes.

REVISÃO DA LITERATURA



## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Fibroblasto/ Fibrócito/ Miofibroblasto

O fibroblasto é a célula encontrada na maioria dos tecidos e tem prolongamentos citoplasmáticos irregulares; possuem núcleo claro, grande, de forma ovóide, com cromatina fina e nucléolo evidente (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2005). Aspectos característicos desta célula incluem expressão de vimentina na ausência de desmina e  $\alpha$ -actina de músculo liso. Quando associados a moléculas de matriz extracelular, os fibroblastos exibem retículo endoplasmático abundante e aparelho de Golgi proeminente. Formam citoesqueleto de proteínas juntamente com células de superfície, as integrinas e a matriz extracelular, facilitando a motilidade das células e a produção de importantes forças contráteis na homeostasia da reparação tecidual (McANULTY, 2007).

Dentre as funções dos fibroblastos, encontra-se a produção e manutenção homeostática da matriz extracelular do tecido ou órgão no qual são residentes. São células metabolicamente ativas, sendo capazes de sintetizar e secretar os maiores componentes da matriz extracelular, incluindo colágenos, proteoglicanas, fibronectina, tenascina e laminina. Estimativas evidenciaram que cada célula pode sintetizar aproximadamente 3,5 milhões de moléculas de pró-colágeno/dia (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006; McANULTY, 2007). Exibem vários fenótipos, incluindo fibroblastos não-contráteis, miofibroblastos contráteis e um fenótipo intermediário, o protomiofibroblasto. Fibroblastos em quantidade podem ser mantidos ou expandidos pela proliferação de populações residentes, mas em adição, evidências recentes indicaram que eles podem também ser derivados da transição epitélio-mesenquimal ou da circulação, ou ainda, de células-tronco mesenquimais dos tecidos (McANULTY, 2007).

O fibroblasto sofre modificações do seu fenótipo durante a reparação tecidual. Fibroblastos derivados da ferida são caracterizados pelo aumento da

síntese de colágeno e contração, mas diminuem a proliferação quando comparados com fibroblastos de derme normal. Entretanto, quando derivados de macrófagos, via sinalização por citocinas, transformam seu fenótipo para miofibroblastos, um processo fortemente induzido pelo fator de crescimento transformador  $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ). A matriz adjacente também influencia o fenótipo de fibroblastos. Adesão celular promovida pela síntese de matriz extracelular também pode resultar na alteração do fenótipo. Fibroblastos e células endoteliais são as primeiras células na fase proliferativa. Os fibroblastos ao migrarem para o interior do local da ferida o fazem a partir dos tecidos adjacentes e, para isto, necessitam ser ativados de seu estado quiescente. Os fatores de crescimento e as citocinas responsáveis pela ativação e proliferação são principalmente derivados das plaquetas e macrófagos ativados. O mais importante fator de crescimento para proliferação de fibroblastos é o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006).

O fibrócito é uma célula menor e com menos prolongamentos do que o fibroblasto, apresentando aspecto fusiforme, com núcleo alongado, mais escuro e citoplasma acidófilo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2005). Representam aproximadamente 0,5% da população de leucócitos no sangue periférico e possuem morfologia em fuso para aderência em cultura. Expressam marcadores de células hematopoiéticas (CD34), leucócitos (CD11b, CD13 e CD45), bem como produtos de fibroblastos (colágenos I, III e fibronectina) e são distinguidos de monócitos/macrófagos, células dendríticas e linfócitos B pela ausência de marcadores específicos para estes tipos de células (McANULTY, 2007).

Havendo um estímulo adequado, como nos processos de reparo tecidual, os fibrócitos podem voltar a sintetizar fibras, reassumindo a estrutura de célula metabolicamente ativa. Na cicatrização dos ferimentos aparece uma célula chamada miofibroblasto, com características intermediárias entre o fibroblasto e a célula muscular lisa. Esta célula tem morfologia de fibroblasto, mas contém maior quantidade de actina (microfilamentos) e miosina. Os miofibroblastos participam do fechamento dos ferimentos pela contração da cicatriz formada. No tecido conjuntivo adulto, o fibroblasto não se divide com freqüência, entrando em mitose apenas quando ocorre necessidade, como por exemplo, nas lesões teciduais (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2005).

Os miofibroblastos são caracterizados pela presença de fibras de  $\alpha$ -actina de músculo liso. Estas células especializadas estão envolvidas na contração da ferida e no fenômeno retrátil observado durante doenças fibróticas e também têm função no desenvolvimento embrionário. Fatores de crescimento, tais como TGF- $\beta$  e fator de crescimento neural (NGF) podem modular a diferenciação de miofibroblastos (PRAKASH; PAUL; ROBBINS, 2007). A tensão mecânica é um importante sinal, que juntamente com fatores de crescimento, tais como TGF- $\beta$ , induz à diferenciação de fibroblastos modificados. Miofibroblastos são caracterizados pela presença de uma isoforma de  $\alpha$ -actina de músculo liso que é encontrada em células mioepiteliais e células musculares lisas vasculares. Miofibroblastos participam na fase de remodelação da reparação tecidual, pela contração dos feixes de microfilamentos que são ligados à matriz extracelular por meio de integrinas, resultando num local de contração da matriz (GABBIANI, 2003). Durante as fases finais de remodelação e resolução, a produção de metaloproteinases da matriz (MMPs) e inibidores teciduais de metaloproteinases da matriz (TIMPs) pelas células, incluindo modificações nos fibroblastos, favorecem a deposição de matriz extracelular e a degradação da mesma; após, os miofibroblastos desaparecem por apoptose (HINZ; GABBIANI, 2003; McANULTY, 2007).

O mecanismo de regulação da diferenciação dos miofibroblastos não está completamente entendido (HINZ; GABBIANI, 2003). Em um estudo *in vitro*, Prakash, Paul e Robbins (2007) relataram que a aplicação de fibrosina, uma citocina fibrogênica, estimulou a expressão de células na produção de  $\alpha$ -actina de músculo liso em culturas. Adicionalmente, os resultados da administração tópica de fibrosina sugeriram que a mesma representa uma importante função na regulação de fibroblastos durante a reparação tecidual e possibilita uma alternativa terapêutica em fibroses. Além disso, a fibrosina tópica parece ser também importante no processo de cicatrização, uma vez que estimula a diferenciação de miofibroblastos.

## 2.2 Colágeno e Fibras Musculares Esqueléticas

### 2.2.1 Colágeno

O colágeno é a proteína mais abundante do corpo humano, representando 30% do total do organismo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2005; SMITH; RENNIE, 2007), tendo importantes funções na manutenção e integridade de vários tecidos (EMING et al., 2007). Há cerca de 28 tipos de colágenos conhecidos, sendo que a maioria dos encontrados na matriz extracelular são fibrilares e compreendem os principais tipos (I, II, III e V); estes são também a maioria dos colágenos presentes em ossos, tendões, pele e músculo (EMING et al., 2007; SMITH; RENNIE, 2007). Os principais colágenos expressos em pequenos vasos são do tipo IV, XV e XVIII; aqueles localizados em camadas de músculo liso ao redor de grandes vasos compreendem os do tipo VIII, XII e XIV (EMING et al., 2007).

A síntese do colágeno ocorre como a de qualquer outra proteína dentro da célula. A molécula de colágeno é caracterizada pela repetição da seqüência *Gly-X-Y*, onde *Gly* é a glicina, *X* é freqüentemente uma prolina e *Y* uma hidroxiprolina (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006; SMITH; RENNIE, 2007). A unidade protéica que se polimeriza para formar fibrilas colágenas é uma molécula alongada denominada tropocolágeno, que mede 280 nm de comprimento por 1,5 nm de espessura. A molécula de tropocolágeno consiste em três cadeias polipeptídicas dispostas em forma de fita helicoidal, sendo que esta conformação é estabilizada pela prolina, devido a sua estrutura em anel, enquanto a glicina é espaçada regularmente a cada dois aminoácidos por toda a região central da cadeia. As diferenças na estrutura química dessas cadeias são responsáveis pelos vários tipos de colágenos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2005).

De acordo com sua estrutura e função, o colágeno pode ser classificado em grupos: colágenos que formam fibrilas, associados a fibrilas, que formam rede e de ancoragem. Os tipos I, II, III, V e XI pertencem ao grupo que formam fibrilas, sendo o

colágeno do tipo I o mais abundante. A composição relativa determina a estrutura e função: fibrilar ou reticular (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2005; SMITH; RENNIE, 2007).

Freqüentemente, as fibras depositadas são inicialmente dispostas ao acaso, em diversas direções. Este padrão é gradualmente substituído pelo redirecionamento das fibras, quando estas são compactadas em feixes paralelos e bem orientadas na dependência dos movimentos dos fibroblastos e miofibroblastos (ANDRADE, 1999). De acordo com Nanci e Ten Cate (2001), a molécula de colágeno é continuamente sintetizada e degradada, permitindo a remodelação tecidual. A proporção do colágeno recentemente formado que é degradado e que não sofre processo de maturação também varia na dependência do tecido, assim como do estado nutricional. Esta degradação de colágeno imaturo ocorre de forma rápida, dentro de 15 minutos em ratos adultos (SMITH; RENNIE, 2007).

### 2.2.2 Fibras Musculares Esqueléticas

A musculatura esquelética ou estriada representa 40 a 45% do total do peso corpóreo, correspondendo a uma estrutura constituída de células musculares e tecido conjuntivo. É responsável pela sustentação e movimentação corporal devido a sua capacidade de contração e de gerar uma força que é aplicada sobre os ossos e as articulações; na maioria das vezes, essa contração é voluntária, via estímulo nervoso. Esta estrutura é também necessária para dar suporte ao processo de cicatrização que ocorre após o dano ao tecido (KERR, 2000; HUARD; LI; FU, 2002).

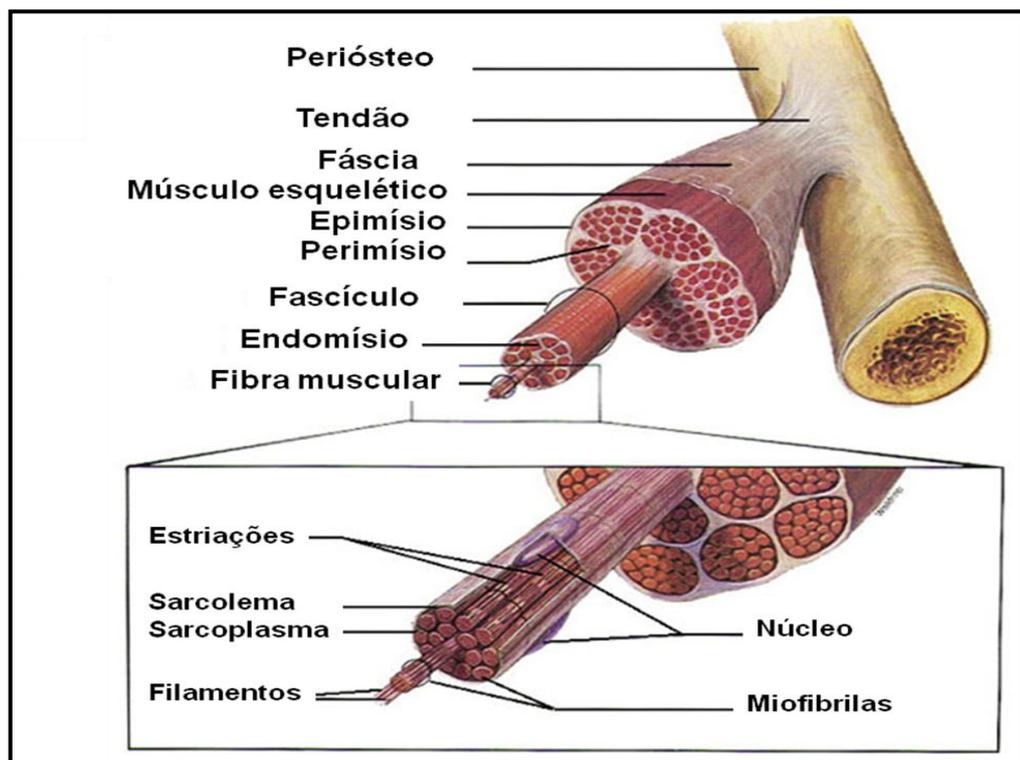
O elemento estrutural básico do músculo esquelético é a fibra muscular ou a miofibra (fig. 1). O músculo esquelético é formado por células cilíndricas alongadas que possuem estriações transversais. As células musculares apresentam características específicas e, em razão disto, seus componentes recebem nomes especiais. O citoplasma da miofibra é chamado sarcoplasma, contém matriz celular e organelas, incluindo aparelho de Golgi, mitocôndria, retículo sarcoplasmático, lípídeos, glicogênio e mioglobina; a membrana citoplasmática é denominada de sarcolema (HUARD; LI; FU, 2002). Os núcleos de uma fibra muscular estriada esquelética estão todos localizados na periferia em contato com o sarcolema (KERR,

2000). A fibra muscular esquelética é derivada da fusão de múltiplos mioblastos. Estes, fusionam-se para formar miotubos, os quais são longos, cilíndricos e multinucleados (HUARD; LI; FU, 2002). Cada fibra muscular é revestida por uma camada de tecido conjuntivo chamada endomísio. Tais fibras são agrupadas em feixes mantidos unidos por outra camada de tecido conjuntivo, o perimísio. Esse grupo de feixes de fibras é denominado fascículo. Os grupos de fascículos com feixe de fibras, cada qual com vasos sangüíneos e tecido nervoso associados, são mantidos juntos por outra camada, o epimísio. Os fascículos circundados por epimísio, que percorrem toda a extensão do músculo esquelético, são circundados por tecido conjuntivo denominado fáscia. Esta, é constituída por tecido conjuntivo denso e resistente que recobre todo o músculo e se estende além deste, constituindo o tendão cuja função é fixar o músculo ao osso (HUARD; LI; FU, 2002; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2005).

No interior de uma fibra muscular existe um número razoável de unidades estruturais orientadas longitudinalmente, as miofibrilas, formadas por filamentos de actina e miosina, as duas principais proteínas contráteis do músculo. As miofibrilas são cilíndricas, com diâmetro entre 1 e 20  $\mu\text{m}$ , podendo ser vistas ao microscópio óptico como estriações transversais com faixas claras e escuras (KERR, 2000). A banda I (isotrópica) apresenta-se mais clara, pois é atravessada facilmente pela luz polarizada, devido aos finos filamentos de actina que a constituem. A banda A (anisotrópica), mostra-se mais escura por ser composta por actina e filamentos espessos de miosina, os quais dificultam a passagem da luz. No centro de cada banda I evidencia-se uma linha transversal escura, a linha Z. O sarcômero é definido com a região da miofibra compreendida entre duas linhas Z. No centro da cada banda A existe uma área mais clara chamada de banda H, exclusivamente constituída de miosina. Ao microscópio eletrônico visualizam-se finos filamentos de actina que partem da linha Z até a borda externa da banda H (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2005).

A lâmina basal é constituída por uma camada externa de tecido conjuntivo de 100 a 200 nm de espessura, por uma camada intermediária e outra densa, mais externa. Contêm várias proteínas, entre estas, colágeno, fibronectina, laminina e muitas glicoproteínas. Entre a lâmina basal e o sarcolema da fibra muscular encontram-se as células satélites, que constituem uma população de células

residentes com grande atividade mitogênica e que contribuem para o crescimento muscular pós-natal, o reparo de fibras musculares danificadas e a manutenção do músculo esquelético adulto. São, ainda, descritas como células indiferenciadas e mononucleadas, cuja membrana basal está em continuidade com a membrana basal da fibra muscular. Em músculo normal estas células são quiescentes, entretanto, em resposta a estímulos como crescimento, remodelação ou trauma, estas são ativadas, proliferam-se e expressam marcadores da linhagem miogênica (HUARD; LI; FU, 2002). Neste estado, também são denominadas mioblastos. Essas células se fundem às fibras musculares já existentes ou se fundem a células satélites vizinhas, para gerar novas fibras musculares. Há evidências de que constituem uma população bastante heterogênea, visto que algumas podem sofrer diferenciação imediata, sem divisão prévia, enquanto outras primeiramente proliferam, gerando uma célula filha para diferenciação e outra para futura proliferação (McFARLAND et al., 2000; ZAMMIT et al., 2002).



**FIGURA 1:** Estrutura do músculo esquelético.

(FONTE: [http://training.seer.cancer.gov/module\\_anatomy/unit4\\_2\\_muscle\\_structure.htm](http://training.seer.cancer.gov/module_anatomy/unit4_2_muscle_structure.htm) (acessado em 20/09/2007))

### 2.3 Reparação Tecidual

A reparação tecidual é considerada um processo fisiológico progressivo e complexo, o qual envolve uma série de eventos celulares, teciduais e bioquímicos sobrepostos, que inicia imediatamente após o dano para restabelecer a estrutura e a função do tecido lesado (MIDWOOD; WILLIAMS; SCHWARZBAUER, 2004; BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006; LI; CHEN; KIRSNER, 2007). Este processo, de acordo com alguns autores, pode ser didaticamente dividido em três fases: inflamatória, proliferativa e de remodelação (GORTI; KOCH, 2002; SARSAM; ELLIOTT; LAM, 2005; BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006; LI; CHEN; KIRSNER, 2007). Outros autores têm dividido a reparação em quatro fases, como a primeira sendo a hemostasia (BRISSET; HOM, 2003; JOHNSTONE; FARLEY, 2005). Entretanto, as fases de reparo da ferida não são eventos lineares simples, mas sim reações e interações interdependentes que ocorrem simultaneamente (SARSAM; ELLIOTT; LAM, 2005; LI; CHEN; KIRSNER, 2007).

Na literatura encontram-se descritos três diferentes tipos de reparação tecidual: por primeira, segunda e terceira intenção. É considerada reparação por primeira intenção aquela onde ocorre o fechamento da ferida logo após o evento, por exemplo, incisões cirúrgicas ou feridas traumáticas limpas e suturadas imediatamente após o dano, ou ainda, com utilização de materiais como grampos ou adesivos cirúrgicos (HOLLINWORTH, 1994; HESS; HOWARD; ATTINGER, 2003; JOHNSTONE; FARLEY, 2005; ENOCH; LEAPER, 2007). Nesta, observa-se mínimo rompimento tecidual e pouca formação de tecido de granulação. Aquela por segunda intenção é caracterizada por feridas deixadas abertas para reparar com ou sem terapia tópica auxiliar (HESS; HOWARD; ATTINGER, 2003). Já a reparação por terceira intenção, ou fechamento primário atrasado ocorre quando a ferida for intencionalmente deixada aberta, por algum intervalo de tempo, isto é, antes de ser realizado o fechamento, as margens não são aproximadas por poucos dias, para permitir antibioticoterapia tópica ou aquelas úlceras que estejam infectadas profundamente. Estas, no entanto, podem resultar em uma maior formação de cicatriz (HESS; HOWARD; ATTINGER, 2003; JOHNSTONE; FARLEY, 2005; ENOCH; LEAPER, 2007).

### 2.3.1 Fases da Reparação Tecidual

Os mesmos mecanismos fisiológicos básicos ocorrem no processo reparacional de todos os tecidos moles que sofrem algum tipo de dano (JOHNSTONE; FARLEY, 2005).

A inflamação é um importante componente efetivo da resposta inicial inata do organismo frente ao dano. Esta atua no sentido de destruir, diluir ou bloquear o agente etiológico agressor, desencadeando uma série de eventos e normalmente guiando a reparação e a restauração da função do tecido lesado. Pode ser subdividida em eventos celulares e vasculares e usualmente tem duração entre 24 e 48 horas, podendo persistir, em alguns casos, por até duas ou mais semanas (LI; CHEN; KIRSNER, 2007).

A fase inflamatória é o estímulo para as fases subseqüentes do processo de reparação da ferida e pode ser prolongada em uma úlcera infectada, crônica ou necrótica, conduzindo a uma inflamação crônica (JOHNSTONE; FARLEY, 2005).

O dano tecidual causa rompimento dos vasos sangüíneos e conseqüente hemorragia, promovendo distúrbio na microcirculação local que culminará na cascata de ativação e liberação de uma variedade de substâncias essenciais ao processo de reparação, tais como fatores quimiotáticos e de crescimento (UENO; HUNT; HOPF, 2006; LI; CHEN; KIRSNER, 2007). Imediatamente após o dano ao tecido, ocorre vasodilatação local, aumento da permeabilidade vascular, extravasamento de sangue e de fluido para o espaço extravascular, bloqueando a drenagem linfática produzindo, assim, os sinais cardinais da inflamação: dor, hiperemia, aumento de volume e temperatura (LI; CHEN; KIRSNER, 2007).

O primeiro passo no processo de reparação tecidual é a hemostasia, a qual consiste de dois processos maiores: desenvolvimento do coágulo de fibrina e coagulação (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006; LI; CHEN; KIRSNER, 2007). Fatores são liberados para atrair plaquetas ao local do dano, os quais incluem mediadores, tais como PDGF e TGF- $\beta$  (HESS; HOWARD; ATTINGER, 2003). Plaquetas são expostas e ativadas pela matriz extracelular no meio intra-vascular e, sob ativação, sofrem adesão, bem como agregação, liberando vários mediadores químicos, como serotonina, adenosina difosfato (ADP), tromboxano A<sub>2</sub> e, também,

proteínas adesivas, como fibrinogênio, fibronectina, trombospondina e fator VIII de Von Willebrand. Estes mediadores e a trombina, produzida localmente, induzem a agregação plaquetária e formam o coágulo, cessando a hemorragia. Durante a hemostasia, as plaquetas também contribuem significativamente no processo de reparo, incluindo inflamação, reepitelização, fibroplasia e angiogênese, influenciando na infiltração de leucócitos por meio da liberação de vários fatores quimiotáticos, como PDGF, TGF- $\alpha$  e TGF- $\beta$  (ENOCH; LEAPER, 2007; LI; CHEN; KIRSNER, 2007).

No início da fase inflamatória, neutrófilos e monócitos são as células predominantes no local da ferida. Mais tarde, o número de neutrófilos declina e macrófagos (originados de monócitos) predominam. Neutrófilos e monócitos são recrutados para a área do dano pela ação dos fatores quimiotáticos liberados durante a hemostasia pelos mastócitos. Outras substâncias liberadas pelos mastócitos, tais como as citocinas pró-inflamatórias, incluindo o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), histamina, proteases, leucotrienos (LTs) e citocinas (interleucinas – IL-1, IL-6, IL-8), interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) representam recursos adicionais de sinais quimiotáticos para o recrutamento de leucócitos, sendo liberadas rapidamente após o dano (GORTI; KOCH, 2002; BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006; LI; CHEN; KIRSNER, 2007). Uma vez no local do dano, receptores de integrinas encontrados na superfície da membrana de neutrófilos melhoram as interações célula-matriz, permitindo aos mesmos a realização da função de destruir e fagocitar bactérias. A infiltração de neutrófilos normalmente tem curta duração (poucas horas ou poucos dias), porém a contaminação na ferida prolonga a presença destes e retarda a reparação (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006; ENOCH; LEAPER, 2007; LI; CHEN; KIRSNER, 2007).

Os macrófagos são considerados as mais importantes células regulatórias na reação inflamatória (ENOCH; LEAPER, 2007). Macrófagos fagocitam, digerem e destroem organismos patogênicos e, ainda, fagocitam os neutrófilos remanescentes (HESS; HOWARD; ATTINGER, 2003; LI; CHEN; KIRSNER, 2007). Estes importantes processos realizados pelos monócitos-macrófagos permitem a indução da angiogênese e formação do tecido de granulação (LI; CHEN; KIRSNER, 2007). Estas células liberam fatores quimiotáticos (por exemplo, fibronectina) que atraem fibroblastos para a área da ferida. Há formação de novos vasos sanguíneos que

seguem um gradiente de fatores angiogênicos produzidos por macrófagos hipóxicos, porque macrófagos não produzem estes fatores quando oxigenados. Podem, ainda, ser considerados como grandes produtores de fatores de crescimento, incluindo PDGF, fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), TGF- $\beta$  e TGF- $\alpha$ . Estas citocinas são importantes na indução de migração celular, bem como na proliferação e produção de matriz, sugerindo que aparecem para indicar a transição entre a inflamação e o reparo (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006; LI; CHEN; KIRSNER, 2007).

A formação da matriz extracelular é um evento fundamental desde o início da reparação, participando ativamente na formação do tecido de granulação, maturação e na remodelação tecidual. O desenvolvimento de novos capilares venosos é dependente não somente das células e citocinas presentes, mas também da produção e organização dos componentes da matriz extracelular. A matriz extracelular é importante para a formação de vasos sanguíneos e manutenção pela ação como suporte, por meio da qual, queratinócitos, fibroblastos e células endoteliais podem migrar; servindo, ainda, como um reservatório e modulador para fatores de crescimento, os quais atuam como mediadores da reparação, sendo responsáveis pela sinalização intracelular. A matriz extracelular liga-se às células por meio de receptores específicos de superfície, dos quais as integrinas são os maiores receptores para a matriz extracelular. Muitos sinais ativados por integrinas são também ativados após estimulação dos fatores de crescimento, sugerindo que a resposta celular mediada por ambos tenha ação sinérgica ou coordene alterações bioquímicas celulares. Estudos recentes mostraram que lamininas são umas das maiores proteínas da matriz extracelular na angiogênese (LI; CHEN; KIRSNER, 2007).

A fase proliferativa inicia-se, aproximadamente, três a quatro dias após o dano, concomitantemente com o término da fase inflamatória (UENO; HUNT; HOPF, 2006; ENOCH; LEAPER, 2007) e estende-se até cerca de dez dias (SARSAM; ELLIOTT; LAM, 2005; UENO; HUNT; HOPF, 2006; ENOCH; LEAPER, 2007). Esta fase caracteriza-se pela formação de uma barreira permeável, isto é, a epitelização, o estabelecimento de suprimento sanguíneo apropriado, ou seja, a angiogênese e a síntese de colágeno que determina o reforço do tecido dérmico lesado, a fibroplasia

(SARSAM; ELLIOTT; LAM, 2005; UENO; HUNT; HOPF, 2006; LI; CHEN; KIRSNER, 2007).

Durante esta fase, monócitos diferenciam-se em macrófagos, liberando inúmeros fatores de crescimento responsáveis pela formação de tecido de granulação e angiogênese. O tecido de granulação possui, além dos macrófagos, outras células em sua matriz extracelular, dentre elas, células endoteliais, eritrócitos, leucócitos e células gigantes, que representam um tecido heterogêneo e dinâmico, por envolver intensa atividade de proliferação celular e secreção de proteínas. Os mais importantes fatores de crescimento associados com a reparação tecidual são: FGF, VEGF, TGF- $\beta$ , PDGF, TGF- $\alpha$ , fator de crescimento epidermal (EGF), TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$  (BRISSETT; HOM, 2003). Durante a angiogênese, FGF e VEGF são responsáveis pela proliferação das células endoteliais e síntese de novos vasos sanguíneos. O processo de epitelização é estimulado pelos fatores de crescimento que são sintetizados e liberados a partir das plaquetas e macrófagos (BRISSETT; HOM, 2003; BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006).

Fibroblastos migram do tecido conjuntivo adjacente, proliferam e começam a sintetizar uma ancoragem para suporte constituída por fibronectina e componentes da matriz extracelular, tais como colágeno, elastina e integrinas (BRISSETT; HOM, 2003). Os fibroblastos localizados no interior da ferida começam a sintetizar colágeno e transformam-se em miofibroblastos para realizar a contração da ferida (induzidos por macrófagos a partir da liberação de TGF- $\beta_1$ ). Em resposta ao estímulo de PDGF, os fibroblastos começam a sintetizar uma matriz provisória constituída por colágeno tipo III, glicosaminoglicanas e fibronectina. Integrinas são componentes da matriz e são reguladas por TNF- $\alpha$ . Em uma ferida incisional, o pico do nível de expressão de TGF- $\beta$  é encontrado por volta do sétimo ao décimo quarto dia e direciona a produção da matriz extracelular e a sua degradação. TGF- $\beta$  estimula os fibroblastos a sintetizar colágeno do tipo I, diminuindo a produção de MMPs devido ao aumento na produção de TIMPs; ocorrendo o aumento na produção de proteínas de adesão celular (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006).

A contração da ferida começa logo após o dano e o pico é alcançado em duas semanas. O grau de contração da ferida varia com a profundidade da mesma. Para feridas rasas, a contração é uma importante parte da reparação e é responsável por mais de 40% de diminuição no tamanho da mesma. Em feridas de

média profundidade, a contração é menor quando comparada com as rasas e diretamente proporcional à profundidade. Miofibroblastos são mediadores predominantes deste processo de contração, em razão da sua habilidade de extensão e retração. Durante a formação do tecido de granulação, fibroblastos são gradativamente modulados entre os miofibroblastos, os quais são caracterizados com feixes de microfilamentos de actina (não vistos em fibroblastos da pele normal), similares àqueles identificados em células musculares lisas, ao longo da membrana citoplasmática (LI; CHEN; KIRSNER, 2007).

Os miofibroblastos contêm uma das maiores concentrações de actina e miosina do que quaisquer outras células. As células dentro da ferida alinham-se ao longo de uma linha e a contração da ferida ocorre na direção das linhas de tensão da pele. Esta contração muscular de miofibroblastos é mediada por PDGF1, 5-hidroxitriptamina, angiotensina, vasopressina, bradicinina, epinefrina e noraepinefrina. A contração é uniforme e requer comunicação célula-célula e célula-matriz. O padrão de contração é proporcional à concentração de colágeno (MIDWOOD; WILLIAMS; SCHWARZBAUER, 2004; LI; CHEN; KIRSNER, 2007).

A quantidade de colágeno necessária para preencher a ferida é relativa ao volume do defeito a ser preenchido. Feridas que são fechadas por aproximação das bordas e sutura necessitam uma menor quantidade de colágeno; contrariamente, àquelas feridas que são reparadas por segunda intenção que necessitaram de uma maior quantidade, às quais, requerem uma fase proliferativa mais prolongada. A produção de colágeno continua por semanas ou meses e é dependente do aporte de oxigênio e nutrientes (SARSAM; ELLIOTT; LAM, 2005).

A fase de remodelação consiste na deposição de matriz e subseqüentes alterações, ocorrendo durante todo o processo de reparo. O coágulo de fibrina formado no início da fase inflamatória é substituído pelo tecido de granulação, que é rico em colágeno tipo III e vasos sangüíneos; durante a fase proliferativa é, subseqüentemente, substituído por uma cicatriz de colágeno, na qual há o predomínio de colágeno do tipo I, com menor número de vasos sangüíneos maduros. As fibras colágenas são constituídas por cerca de 80% de peso dissecado de derme humana normal e são as principais proteínas estruturais que fornecem resistência e dureza para o tecido dérmico. Em adultos saudáveis, o colágeno tipo I

contém, aproximadamente, 80% do colágeno e o tipo III constitui 10% do colágeno da derme (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006; LI; CHEN; KIRSNER, 2007).

Durante o início da reparação, similar à derme fetal, há o predomínio do colágeno tipo III, sendo este sintetizado por fibroblastos no tecido de granulação após 48 a 72 horas e é maximamente secretado entre cinco e sete dias. A quantidade total do colágeno aumenta no início da reparação, alcançando máxima produção entre duas a três semanas após o dano. Acima do período de um ano ou mais, a derme gradativamente retorna ao seu fenótipo anterior ao dano, constituída na sua grande maioria por colágeno do tipo I. Resistência à tensão dentro de uma estimativa funcional do colágeno, aumenta para 40% da resistência antes do dano em um mês e pode continuar a aumentar pelo período de um ano, alcançando até 70 a 80% (ENOCH; LEAPER, 2007; LI; CHEN; KIRSNER, 2007).

À medida que o reparo progride, ocorre uma formação gradual de colágeno com a degradação do colágeno do tipo III e aumento na síntese de colágeno do tipo I. O processo desta conversão da derme é acompanhado pela síntese controlada de novo colágeno e lise do colágeno antigo, principalmente pela ação das MMPs. O estímulo para esta conversão pode ser o estresse biomecânico e/ou a pressão transversal localizada no fechamento da ferida. MMPs não são usualmente detectáveis ou encontram-se em níveis muito baixos nos tecidos remanescentes saudáveis, sendo as mesmas induzidas durante a reparação tecidual, em resposta a citocinas, fatores de crescimento e/ou contato de célula com a matriz extracelular. A atividade catalítica das MMPs é também controlada, em parte, por uma família de TIMPs, os quais, se ligam especificamente a MMPs. O balanço entre as atividades de MMPs e TIMPs é, também, fundamental na reparação e remodelação (BROUGHTON, JANIS; ATTINGER, 2006; LI; CHEN; KIRSNER, 2007). Durante esta fase há um decréscimo progressivo na vascularização da ferida e o tecido cicatricial torna-se pálido. A ferida adquire resistência com o colágeno maduro, embora o tecido cicatricial não exceda mais do que 80% da resistência original, estando na dependência da organização efetiva sobre a matriz colágena. O remodelamento envolve etapas sucessivas de produção, lise e orientação das fibrilas de colágeno (JOHNSTONE; FARLEY, 2005).

A deposição de colágeno no material amorfo, constituído principalmente por proteoglicanas, é feita a princípio, de maneira aleatória tendo como orientação a

fibronectina, sendo dependente da natureza e direção das tensões aplicadas ao tecido. A molécula do colágeno é continuamente sintetizada e degradada, permitindo a remodelação tecidual (NANCI; TEN CATE, 2001). O aspecto de ordenação dos feixes colágenos de forma paralela, bem como a birrefringência torna fácil a sua visualização por meio da microscopia de luz e eletrônica (MONTES, 1996).

Nesta fase, os linfócitos constituem o sub-sistema leucocitário mais abundante em feridas humanas (ENGELHARDT et al., 1998). Os linfócitos não são somente efetores imunes, mas também produtores de fatores de crescimento. Nesta etapa, essas células são atraídas para a região da ferida em igual número que os monócitos. Os eosinófilos aparecem nas últimas fases do reparo e presume-se que podem estar relacionados à produção de fatores de crescimento (BLOTNICK et al., 1994). A completa reparação do tecido é alcançada quando os finos microfilamentos de actina e miosina gradualmente desaparecem do citoplasma dos miofibroblatos e nenhuma junção é observada entre os fibroblastos (RUNGGRE-BRANDLER; GABBIANI, 1983).

Embora a reparação tecidual envolva as fases descritas, fatores sistêmicos e/ou locais podem afetar a evolução normal dessas fases, resultando na cronificação ou a falta de reparação da ferida ou, ainda, excessiva fibrose (cicatrização hipertrófica ou formação de quelóide), podendo até alterar a estrutura e a função (LI; CHEN; KIRSNER, 2007). Os maiores fatores locais que podem interferir no curso da reparação incluem dimensão e localização do ferimento, pressão, presença de infecção e tecido necrótico. Sistemicamente, a reparação tecidual pode ter seu tempo de evolução prolongado pela influência de fatores como idade, enfermidades crônicas e, em particular, insuficiências vasculares e nutricionais, incluindo também doenças autoimunes, neuropatias e uso de esteróides (HESS; HOWARD; ATTINGER, 2003; JOHNSTONE; FARLEY, 2005; ENOCH; LEAPER, 2007; LI; CHEN; KIRSNER, 2007).

## 2.4 Radiação **LASER**

Os principais conceitos da radiação laser basearam-se nos princípios da Teoria Quântica Eletrodinâmica proposta por Einstein em 1917. No entanto, somente em 1958, com Schawlow & Townes\*, os primeiros estudos foram realizados, sendo Maiman\*\*, em 1960, o criador do primeiro laser operacional usando cristal de rubi. A partir deste, foram desenvolvidos lasers que servem as mais diversas finalidades, denominados genericamente como lasers de baixa ou alta potência. Hoje, há diversos tipos de lasers distinguidos conforme os meios ativos que os produzem. Dentre os mais utilizados, têm-se os de Argônio, Diodo, Dióxido de Carbono (CO<sub>2</sub>), *Neodymium Yttrium - Aluminum - Garnet* (Nd:YAG), Holmiun, Hélio-Neônio e Erbiun:YAG (NICCOLI-FILHO; OKAMOTO, 1994; CLAYMAN; KUO, 1997; HORCH; DEPPE, 2005).

A palavra laser é um acrônimo que, na língua inglesa, significa *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*. A radiação laser tem como características a unidirecionalidade, geração de um feixe paralelo de radiação eletromagnética, comprimento de onda único, produzindo uma fonte de luz monocromática, colimada e muito intensa (POGREL, 1989; CLAYMAN; KUO, 1997; HORCH; DEPPE, 2005). Para a compreensão de quais as diferenças entre o feixe de laser e a luz comum, devem-se observar certas propriedades físicas específicas deste, tais como: coerência, monocromaticidade, colimação e brilhância. A coerência é a capacidade da luz laser de ser ordenada e altamente direcionada. O feixe de laser mantém uma relação de fase constante entre duas posições, no espaço (coerência espacial) e no tempo (coerência temporal), justificando o seu baixo grau de divergência. A radiação da luz laser diverge, em aproximadamente 1 mm em sua extensão; por conseguinte, pode ser programada sobre grandes distâncias, sem perda substancial de intensidade; já a luz comum é emitida de maneira difusa ou multidirecional (CLAYMAN; KUO, 1997). Outra propriedade importante é a monocromaticidade: a radiação laser produz uma banda de luz pura, sendo que o seu

---

\* SCHAWLOW, A.L., TOWNES, C.H. Infrared and optical masers. *Phys Rev*, v.112, p.1940-9, Dec. 1958.

\*\* MAIMAN, T.H. Stimulated optical radiation in rubi. *Nature*, v.187, p.493-4, Aug.,1965.

comprimento de onda depende unicamente das características do meio ativo, emitindo radiação de um único comprimento de onda. Esta propriedade é terapeuticamente importante, pois permite absorção seletiva da energia para cores específicas (componente de absorção de luz ou cromóforos). Em contrapartida, fontes de luz comum, como as lâmpadas incandescentes, emitem todas as cores - através do espectro eletromagnético visível em nuances do infravermelho - e, por isso, parecem brancas (CLAYMAN; KUO, 1997). A colimação ou direcionalidade diz respeito à propagação do feixe de laser por longas distâncias, com baixa divergência, sendo a luz laser colimada pelos sistemas ópticos a um feixe extremamente fino (LEHNERT, 1996; CLAYMAN; KUO, 1997). A brilhância ocorre como resultado de um processo de amplificação de potências muito altas geradas pela luz laser em virtude do baixo grau de divergência do seu feixe e, ainda, pela capacidade de concentração do feixe focal, ou seja, o laser pode concentrar grandes potências luminosas em pequenas áreas (LEHNERT, 1996; CLAYMAN; KUO, 1997).

Além das propriedades específicas do feixe de laser, os instrumentos que o produzem possuem algumas características que permitem ampliar a sua gama de recursos. Dentre estas podemos citar a sintonia e as operações contínua ou pulsada. A sintonia é a capacidade de poder escolher o comprimento de onda emitido, dentro de certos intervalos característicos do meio ativo. Isto é conseguido mediante a utilização de componentes ópticos específicos e da adequação da geometria do feixe (SCHWAB\*, 1999).

Os modos contínuo ou pulsado estão relacionados com os tipos de aparelhos de emissão de radiação laser. Estes apresentam diversos desenhos para seus dispositivos ópticos e elétricos, podendo produzir feixes de onda contínua ou pulsada. O modo contínuo gera temperaturas muito maiores sobre os tecidos, já o pulsado produz pulsos curtos individuais de picos de força relativamente altos. A utilização de um desses recursos depende de cada situação e da preferência do profissional, com base em vários estudos sobre qual o melhor tipo de feixe a ser utilizado (NICCOLI-FILHO et al., 1997; HORCH; DEPPE, 2005).

A extensão, na qual há interação entre o tecido e a radiação laser é determinada pela fluência e geometria do feixe do laser (FERREIRA; NARY-FILHO;

---

\* CARLOS SCHWAB. (Aula da Disciplina de Laser do Curso de Pós graduação em Odontologia da FOSJC-UNESP, 1999). Comunicação pessoal.

CARVALHO-JÚNIOR, 1996; CLAYMAN; KUO, 1997). A posição e a extensão do dano térmico produzido dependem do comprimento de onda, da intensidade e duração da irradiação laser sobre o tecido. A densidade do fluxo de energia (Intensidade), fator que mensura a quantidade de dano tecidual, medida em watts por centímetro quadrado ( $W/cm^2$ ) é alterada drasticamente com um simples focar e desfocar do feixe do laser, podendo-se controlar, desta forma, o tipo de dano tecidual (CLAYMAN; KUO, 1997; HORCH; DEPPE, 2005).

Quase todos os tipos de lasers são absorvidos pelos tecidos moles da cavidade bucal. Isso ocorre devido ao seu alto teor de água e à intensa vascularização presente nesses tecidos (GUTKNECHT; FRANZEN, 2004).

É importante salientar que o uso de densidades de energias maiores pode levar ao acúmulo de calor e dano térmico às estruturas adjacentes. Maiores parâmetros de energia e tempo implicam em maior temperatura e danos térmicos e, assim, o tempo para a reparação, conseqüentemente, será maior. O diâmetro do feixe de radiação laser também determina variação na densidade de potência: quanto maior o diâmetro, maior a densidade, porém este parâmetro é fixo, ou seja, inerente ao tipo de aparelho. Portanto, a quantidade de destruição tecidual e a profundidade de penetração do feixe de radiação laser variam de acordo com o tamanho do feixe, densidade de potência e/ou energia, e a duração da exposição do tecido à radiação laser. Diversos estudos experimentais têm sido realizados no sentido de elucidar seus efeitos nos tecidos moles, variando-se os parâmetros e comparando-se as diferentes técnicas cirúrgicas com bisturi convencional e elétrico (WILDER-SMITH; ARRASTIA; LIAW, 1995; PINHEIRO et al., 2002).

A radiação laser de alta potência pode atuar sobre o tecido de três formas: promovendo sua vaporização (ablação), coagulação ou sua incisão/ excisão (SULLINS, 2004; HORCH; DEPPE, 2005). Incisão/ excisão pode ser comparada com bisturi convencional ou elétrico, mas a interação laser/tecido não tem contrapartida em cirurgia convencional. A ativação destes efeitos é dependente da densidade de potência (Watts de energia laser aplicados por unidade de área do tecido), comprimento de onda da luz laser e as propriedades do tecido alvo (SULLINS, 2004).

#### 2.4.1 Lasers de CO<sub>2</sub> e de Nd:YAG

O laser de CO<sub>2</sub> foi desenvolvido por Patel (1964) e obtido por estimulação dos gases de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), nitrogênio (N<sub>2</sub>) e hélio (He), sendo o N<sub>2</sub> e o He responsáveis pelo aumento de sua eficiência. Este tipo de laser produz energia com um comprimento de onda de 10,6 μm que o coloca na porção infravermelha do espectro eletromagnético, invisível ao olho humano e próximo ao maior pico de absorção espectroscópica para a água (CLAYMAN; KUO, 1997; HORCH; DEPPE, 2005). A extensão na qual há interação entre o tecido e a radiação laser é determinada pelo conteúdo de água dos tecidos e pela irradiação, fluência e geometria do feixe do laser. Em virtude de sua ação ser basicamente por absorção de água dos tecidos, quanto menor a quantidade de água, maior o dano tecidual. É o que ocorre quando se irradiam tecidos como ossos, tendões ou gordura (FERREIRA; NARY-FILHO; CARVALHO-JÚNIOR, 1996; CLAYMAN; KUO, 1997).

Para a realização de vaporização, basta afastar do tecido a peça de mão do aparelho de emissão de radiação laser, distanciando o seu ponto focal. Isto equivale a desfocar o feixe, gerando, assim, temperaturas menores, que promovem um dano mais superficial, sobre uma área maior. Em contrapartida, para incisionar um tecido, a radiação laser deve atuar com seu ponto focal sobre este, promovendo-se, assim, altas temperaturas em uma área restrita (HORCH; DEPPE, 2005).

As cirurgias realizadas com esse tipo de radiação laser também podem ser indicadas levando-se em conta aspectos inerentes às condições de saúde geral do paciente. Pacientes com distúrbios sangüíneos e que estão sob uso de medicamentos anticoagulantes, portadores de marca passo ou outros aparelhos de monitoramento eletrônico, pacientes nos quais as perdas sangüíneas devem ser evitadas e, ainda, em lesões vasculares seriam beneficiados com as cirurgias a laser (BARAK; KAPLAN; ROSENBLUM, 1990). Dentre as principais vantagens na utilização da radiação laser CO<sub>2</sub> têm-se: incisão rápida ou ablação dos tecidos, danos mínimos à área de tecido normal adjacente à área de tratamento; preservação de margens adequadas a realização de análise histológica, boa hemostasia trans-operatória, ação esterilizante do feixe no ponto de sua aplicação no tecido, diminuição do edema pós-operatório, formação mínima de escaras, manipulação mínima dos

tecidos, flexibilidade do tecido cicatricial, além de menor desconforto pós-operatório, devido à vaporização das terminações nervosas (ROMANOS; NENTWIG, 1996; THUAKSUBAN; NUNTANARANONT, 2003). Esses aspectos positivos da aplicação da radiação laser de CO<sub>2</sub> propiciaram melhora na qualidade das cirurgias buco-maxilofaciais, sobretudo pela possibilidade de manipulação da mucosa sem a ocorrência de episódios hemorrágicos, edemas, dor pós-operatória ou formação de fibrose e por não haver necessidade de sutura na grande maioria dos casos (ALAMILLOS-GRANADOS et al., 1993; SINHA; GALLAGHER, 2003). Embora, haja mínima dor no pós-operatório imediato, episódios com sintomatologia dolorosa podem ser observados três a quatro dias do pós-operatório, podendo persistir até duas semanas. Entretanto, comparado à cirurgia convencional, a cirurgia com radiação laser de CO<sub>2</sub> parece causar menor severidade nos episódios de dor e edema, sialorréia, disfonia e disfagia (NICCOLI-FILHO; MOROSOLLI, 2003).

Estudos clínicos mostraram que a reparação da mucosa bucal e outras regiões do corpo submetidas à radiação laser de CO<sub>2</sub> apresentaram menor grau de cicatriz e contração tecidual quando comparada com a reparação resultante de métodos cirúrgicos convencionais (FISHER et al., 1983; SULLINS, 2004). Isto está relacionado com a menor quantidade de miofibroblastos e pela falta de organização entre estas células (LUOMANEN; LEHTO; MEURMAN, 1988; ZEINOUN et al., 2001).

Evrard, Nammour e Dourov (1996) avaliaram o processo de reparo em língua de ratos por meio de incisões realizadas com radiação laser de CO<sub>2</sub>, utilizando potência de 5W, modo contínuo e tempo e irradiação de 5 segundos. Os animais foram submetidos à eutanásia imediatamente, dois, quatro, seis, 8, 10 e 30 dias após a irradiação. A análise histológica evidenciou vaporização do fluido intra e extracelular, denaturação das proteínas extracelulares e oclusão dos capilares. Ao segundo dia, observou-se superfície lisa da incisão, ausência de restos necróticos, coberta por fibrina e presença de células polimorfonucleares. No quarto dia, presença do tecido de granulação com capilares orientados perpendicularmente à superfície da ferida, numerosos polimorfonucleares, células mesenquimais e miofibroblastos. Ao décimo dia, houve completa reepitelização da ferida.

Liboon, Funkhouser e Terris (1997) compararam histologicamente os efeitos do bisturi convencional, radiação laser de CO<sub>2</sub>, bisturi elétrico e bisturi elétrico com

voltagem constante em incisões produzidas em língua e mucosa jugal de porcos. Os autores concluíram que entre os instrumentos comparados, o bisturi elétrico com voltagem constante e a radiação laser de CO<sub>2</sub> promoveram a melhor combinação de facilidade do uso, hemostasia e ausência de dano ao tecido. Excisões e incisões realizadas com bisturi elétrico com voltagem constante requerem menor tempo do que às aquelas com radiação laser, mas as feridas cirúrgicas produzidas pelo primeiro apresentaram significativa presença de tecido de granulação nos períodos finais de observação sugerindo que deva existir um atraso no processo de reparo tecidual.

Romanos, Siar e Toh (1999) produziram incisões cirúrgicas em palato duro de macacos utilizando bisturi elétrico e radiação laser de CO<sub>2</sub>, este, com potências de 2W, 4W e 6W, em modo contínuo e tempo de irradiação de 6 segundos para avaliar o processo de reparação. Os resultados histológicos mostraram que nas incisões realizadas com radiação laser de CO<sub>2</sub> houve presença de necrose tecidual e uma marcada reação inflamatória diretamente relacionada com o aumento da potência utilizada. Ao terceiro dia, a superfície do epitélio foi substituída por exsudato fibrinopurulento. No tecido conjuntivo, observou-se fragmentação e desorientação das fibras colágenas, infiltrado de células inflamatórias presentes tanto na inflamação aguda como na crônica. Ao sétimo dia, observou-se completa epitelização da ferida cirúrgica e, no tecido conjuntivo, pequenas quantidades de fibrilas colágenas novas entre as já existentes, bem como discreto infiltrado de células inflamatórias mononucleares. As feridas produzidas com o bisturi tiveram completa epitelização ao terceiro dia, com evidência de atividade fibroblástica e discreto infiltrado de células mononucleares. Ao décimo quarto dia foi observada completa reparação do epitélio e do tecido conjuntivo nos dois tipos de incisões. De acordo com os resultados obtidos, a radiação laser de CO<sub>2</sub> provocou alterações no tecido e uma intensa reação inflamatória retardando o processo de reparo no estágio inicial.

Patrocínio e Niccoli-Filho (2000) avaliaram histologicamente a reparação da mucosa bucal de ratos submetidos à radiação laser de CO<sub>2</sub> com diferentes potências (2, 7 e 10 Watts, por 5 segundos, modo contínuo, com foco de 0,8 mm) nos períodos imediatamente, três e sete dias pós-irradiação. Os resultados imediatos mostraram em todos os grupos presença de necrose por coagulação, atingindo o tecido muscular com maior profundidade no grupo irradiado com 10 Watts de potência. Os autores concluíram que o grupo de animais irradiados com 2 Watts de potência não

apresentou diferenças e/ou atraso significantes na cronologia de reparo, mostrando-se esta potência adequada para uso em mucosa. Os mesmos autores descreveram, ainda, que a fina camada de colágeno denaturado observada clinicamente na superfície da área irradiada, nos primeiros períodos subseqüentes à irradiação, poderia agir como um curativo biológico impermeável, reduzindo o grau de irritação dos tecidos envolvidos.

A resposta cicatricial de incisões cirúrgicas realizadas com lasers de alta potência mostra-se diferente das incisões produzidas pelo método convencional, em razão da formação de uma camada de carbonização na superfície da ferida, a qual exerce função de cobertura e proteção. Após 24 horas, inicia-se a formação de um coágulo fibrinoso superficial. O epitélio de regeneração cobre o coágulo de fibrina nas margens da ferida, caracterizando a cicatrização por segunda intenção. Ocorre a proliferação do epitélio entre o coágulo superficial e o tecido de granulação subjacente. Adicionalmente, evidencia-se reação inflamatória menor, assim como a quantidade de miofibroblasto presentes, com isso há menor contração da ferida e menor quantidade de colágeno é formada, ocorrendo atraso na regeneração do epitélio (FISHER; FRAME, 1984).

Paes-Júnior e Niccoli-Filho (2001) compararam macroscopicamente a evolução da reparação tecidual entre incisões cujas margens foram fechadas por meio de sutura e/ou vaporização com radiação laser de CO<sub>2</sub>. A análise macroscópica foi realizada nos períodos imediatamente, 24 horas, três, sete, 14 e 21 dias pós-operatórios. Os resultados evidenciaram atraso no início da reparação nas incisões vaporizadas; porém, aos 21 dias, ambos os grupos mostraram as mesmas características macroscópicas. Entretanto, a incisão vaporizada não mostrou trauma mecânico do tecido observado nas incisões suturadas e nenhuma complicação hemorrágica foi evidenciada. Os autores sugeriram que a radiação laser de CO<sub>2</sub> pode, eventualmente, substituir a necessidade de sutura.

Sinha e Gallagher (2003) compararam a radiação laser de CO<sub>2</sub> com bisturi convencional, bisturi ultra-sônico e bisturi elétrico ao realizarem incisões na mucosa bucal de porcos. Histologicamente os autores observaram que as feridas produzidas pela radiação laser apresentaram uma zona de tecido coagulado, necrose, inflamação aguda com presença de neutrófilos nas primeiras duas semanas de avaliação e, aos 28 dias linfócitos e macrófagos, com áreas de necrose tecidual e

atraso na epitelização. Os demais instrumentos promoveram completa epitelização e resolução do processo inflamatório aos sete dias.

A radiação laser de alta potência como o Nd:YAG possibilita diversas aplicações em áreas da medicina e odontologia e está indicada, sobretudo, nas cirurgias de tecidos moles. Este tipo de radiação laser emite luz na frequência próxima à faixa do infravermelho do espectro eletromagnético, com comprimento de onda de 1.064nm, podendo a energia ser entregue sob os modos contínuo ou pulsado, sendo utilizada a forma sem contato e com contato com o tecido alvo, por meio de fibra óptica. Dentro do modo sem contato, o laser de Nd:YAG tem valor limitado na cavidade bucal devido a profundidade de penetração espalhar-se. Lesões de maior espessura situadas profundamente podem, entretanto, ser tratadas com radiação laser de Nd:YAG, geralmente utilizando 20 a 30 Watts de potência. Porém, os mesmos autores ressaltaram que cuidados devem ser tomados para não ocorrer excessiva ablação utilizando alta potência, o que poderia levar à formação de cicatrização hipertrófica e necrose de coagulação, com subsequente hemorragia pós-operatória (CATONE; ALLING, 1997).

Bradley (1997) descreveu que o comprimento de onda da radiação laser de Nd:YAG exibe mínima absorção pelos tecidos e máxima penetração quando comparada com radiação laser de CO<sub>2</sub>, o qual mostra máxima absorção e mínima penetração aos tecidos. Estas propriedades permitem uma variedade de usos em cirurgia maxilofacial, particularmente na coagulação de lesões angiomasas, hemostasia, cirurgia artroscópica da articulação têmporo-mandibular, em combinação com laser de CO<sub>2</sub> para ressecção de tecidos vasculares, como por exemplo, hemiglossectomia e tratamento de neoplasias malignas. O laser de Nd:YAG oferece a possibilidade de melhor coagulação nos tecidos vasculares em comparação com a radiação laser de CO<sub>2</sub>. A baixa absorção por parte dos tecidos não somente faz a radiação ter potencial para penetrar profundamente, mas também espalha a radiação na superfície, a qual pode produzir alterações parciais aos tecidos subjacentes. Isto em comparação ao corte produzido pela radiação laser de CO<sub>2</sub>, cujo dano periférico pode ser menor (cerca de 0.2mm ou 200µm), levaria a predizer alguma sintomatologia a mais e edema ao ser utilizada a radiação laser de Nd:YAG.

Lippert et al. (2003) realizaram estudo histológico da mucosa da laringe de 11 pacientes que sofreram incisão com radiação laser para melhorar obstrução das vias aéreas e um estudo clínico em 24 pacientes com câncer orofaríngeo, os quais foram tratados com cirurgia a laser de CO<sub>2</sub> e de Nd:YAG com o objetivo de avaliar a cronologia da reparação tecidual. Os resultados histológicos evidenciaram que no início houve um retardo no processo de reparação após a ressecção cirúrgica da lesão neoplásica com radiação laser e foi observada uma dependência do tamanho inicial do defeito cirúrgico. A média de duração da reparação tecidual após cirurgia com radiação laser de CO<sub>2</sub> foi significativamente menor do que aquelas realizadas com radiação laser de Nd:YAG. Devido a uma pronunciada zona de necrose na base da ferida, este efeito foi mais evidente com radiação laser de Nd:YAG. Entretanto, a diferença na cronologia da reparação tecidual entre ambos os tipos de lasers não pareceu ter influência negativa nos resultados.

Walfisch et al. (2004) avaliaram e compararam procedimentos cirúrgicos realizados com radiação laser de Nd:YAG e CO<sub>2</sub> com a técnica cirúrgica convencional em pacientes com cisto pilonidal durante um período de nove anos. Os grupos foram comparados considerando-se episódios hemorrágicos, tempo de reparação tecidual, ocorrência de infecção pós-operatória e recorrência da lesão. Os resultados evidenciaram que o tempo de reparação foi consideravelmente menor em ambos os grupos tratados com radiação laser. Episódios hemorrágicos e infecção pós-operatória, bem como recorrências foram menores nestes grupos. Ambos os lasers produziram resultados similares. A principal vantagem na comparação entre os procedimentos cirúrgicos que utilizaram a radiação laser em relação ao método convencional foi o tempo menor de reparação da ferida e a simplicidade da técnica.

Camacho-Alonso e López-Jornet (2007) avaliaram a reparação tecidual em ratos albinos, nos quais produziram incisões em dorso de língua com bisturi convencional, criocirurgia, eletrocautério e radiação laser de CO<sub>2</sub>. Os animais foram divididos em seis grupos. Nos primeiros três grupos, as feridas foram produzidas com bisturi convencional, nenhuma substância foi aplicada no primeiro grupo; no segundo grupo foi aplicado N-butyl-2-cianocrilato sobre a ferida pós-cirúrgica e, no terceiro, ácido tri-cloroacético a 50%. Nos grupos quarto, quinto e sexto as incisões foram produzidas com criocirurgia, eletrocautério e radiação laser de CO<sub>2</sub>, respectivamente. Foram mensurados aspectos como hemorragia, condições pós-operatórias para

ingestão de alimentos e reparação tecidual. Os resultados mostraram que nas feridas cirúrgicas onde foi aplicado N-butyl-2-cianocrilato não foram observados episódios hemorrágicos e houve rapidez na reepitelização, bem como na resolução da resposta inflamatória. Os autores concluíram que N-butyl-2-cianocrilato é uma boa substância hemostática para cuidados de feridas cirúrgicas produzidas por bisturi convencional em mucosa oral.

OBJETIVOS



### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivos Gerais**

Avaliar o processo de reparação tecidual em borda lateral de língua de hamster após exérese de lesão, induzida quimicamente por oleato de monoetanolamina 5% (Ethamolin<sup>®</sup>), tratada com bisturi convencional, bisturi elétrico e radiação laser de CO<sub>2</sub> e de Nd:YAG, por meio de análises clínica, histomorfológica e estatística da histomorfometria das fibras musculares esqueléticas.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

a) avaliar clinicamente a evolução da reparação tecidual em borda lateral de língua de hamster após exérese de lesão, induzida quimicamente por oleato de monoetanolamina 5% (Ethamolin<sup>®</sup>), tratada com bisturi convencional, bisturi elétrico e radiação laser de CO<sub>2</sub> e de Nd:YAG;

b) avaliar as reações teciduais e a densidade de fibras musculares esqueléticas na região tratada nos diferentes grupos, mediante análises histomorfológica e estatística da histomorfometria, respectivamente.

MATERIAL E MÉTODOS



## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Aprovação do Projeto de Pesquisa**

O projeto desta pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa-Local da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP sob número 021/2006, pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) sob o número 0089/06 e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS sob o número 06/03494 (Anexos C, D e E, respectivamente).

### **4.2 Delineamento da Pesquisa**

Esta pesquisa caracterizou-se por um estudo experimental, comparativo entre grupos.

### **4.3 Caracterização da Amostra**

Para a realização desta pesquisa foram utilizados 80 hamsteres sírios dourados (*Mesocricetus auratus*), de ambos os sexos, com idade aproximada de oito semanas e peso corporal entre 140 a 160 gramas. Os animais foram alojados no Biotério da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP e mantidos sob as condições ambientais, em salas não-climatizadas, providas de exaustor de ar, os quais foram alimentados com ração comercial e água *ad libitum*.

### **4.4 Indução da Lesão em Borda Lateral de Língua**

A lesão em borda lateral da língua, padronizada do lado esquerdo, foi induzida quimicamente através de infiltração de solução aquosa de oleato de monoetanolamina 5% (Ethamolin<sup>®</sup>, Zest Farmacêutica Ltda. Rio de Janeiro, RJ)

administrada em dose única de 10mg/kg/vol. 0,2 ml. O oelato de monoetanolamina é considerado um fármaco de ação esclerosante indicado no tratamento de pequenas lesões vasculares, tais como, hemangioma, varizes ou varicosidades, desde que não exista insuficiência vascular (MASAKI et al. 2002). Atuando na parede endotelial do vaso sanguíneo, onde produz uma resposta inflamatória estéril, resultando em fibrose da parede do vaso com possível oclusão deste. A substância também se difunde rapidamente pela parede do vaso causando uma reação inflamatória extravascular (ZANETTINI et al, 2005).

Para o procedimento de indução, os animais foram anestesiados utilizando-se injeção intraperitoneal de cloridrato de quetamina - (DOPALEN<sup>®</sup>, AgribRANDS do Brasil Indústria e comércio Ltda., São Paulo, Brasil), anestésico de uso veterinário, na dose de 25mg/kg e cloridrato de 2- (2,6- xilidino) – 5,6 dihidro-4H1,3 - tiazina (ROMPUM<sup>®</sup>, Bayer S.A.-Saúde Animal, São Paulo, Brasil), sedativo, analgésico e relaxante muscular, na dose de 5mg/kg.

#### **4.5 Procedimentos Cirúrgicos**

Decorrido período de 72 horas da indução da lesão tecidual, esta, foi observada clinicamente (fig. 2). Os animais foram divididos, aleatoriamente, em quatro grupos de 20 animais cada, de acordo com o que segue:

**Grupo Bisturi Convencional (BC)** - Tratamento cirúrgico com bisturi convencional.

**Grupo Bisturi Elétrico (BE)** - Tratamento cirúrgico com bisturi elétrico.

**Grupo Radiação Laser de Dióxido de Carbono (CO<sub>2</sub>)** - Vaporização com radiação laser de CO<sub>2</sub>.

**Grupo Radiação Laser de Neodímio: Ítrio-Alumínio-Granada (Nd:YAG)** - Vaporização com radiação laser de Nd:YAG.



**FIGURA 2:** Lesão em borda lateral esquerda da língua, 72 horas pós-infiltração de oleato de monoetanolamina 5%. (Ethamolin®). Fonte: Elaborado pelo autor (2008).

Estabelecidos os grupos, os animais foram novamente anestesiados através de injeção intraperitoneal de cloridrato de quetamina - (DOPALEN®, Agribands do Brasil Indústria e comércio Ltda., São Paulo, Brasil), anestésico de uso veterinário, na dose de 50mg/kg e cloridrato de 2- (2,6- xilidino) – 5,6 dihidro - 4H1,3 - tiazina (ROMPUM®, Bayer S.A.-Saúde Animal, São Paulo, Brasil), sedativo, analgésico e relaxante muscular, na dose de 10mg/kg. Imediatamente, foram realizados os procedimentos de exérese da área lesionada.

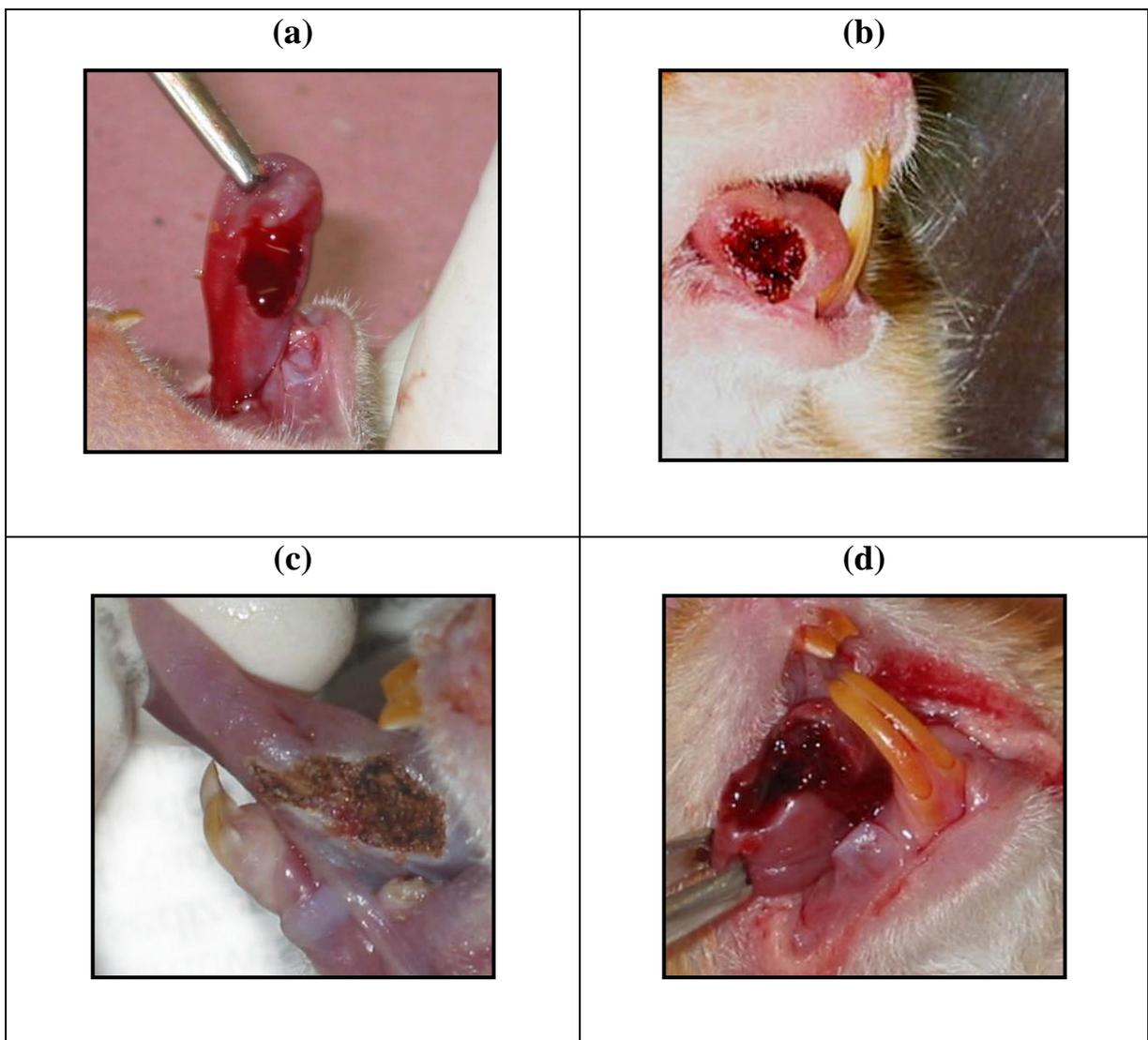
**GRUPO BC:** após a comprovação da efetividade anestésica, tracionou-se a língua do animal com pinça clínica metálica e foi feita a remoção da lesão com lâmina de bisturi convencional número 15 (Solidor, Lamedid Com., São Paulo, SP) (fig. 3a). Após a exérese, fez-se a lavagem do leito cirúrgico com solução estéril de soro fisiológico a 0,9% (cloreto de sódio (NaCl) a 0,9%, Laboratório Sanobiol Ltda. Pouso Alegre, MG, Brasil) e aproximação das bordas cirúrgicas por meio de sutura simples com fio de seda 4-0 (Ethicon®, Johnson & Johnson, São Paulo, SP, Brasil).

**GRUPO BE:** seguiu-se a mesma seqüência dos procedimentos pré-operatórios do grupo BC e a remoção da lesão foi realizada utilizando-se aparelho de bisturi elétrico (BM-560, Medical Cirúrgica Ltda. São Paulo, SP, Brasil), potência de 4 Watts, em modo corte (fig. 3b).

**GRUPO CO<sub>2</sub>:** seguiu-se a mesma seqüência dos procedimentos pré-operatórios do grupo BC, a exérese da lesão foi realizada utilizando-se aparelho emissor de radiação laser de CO<sub>2</sub> (Sharplan 15F, Israel/ FAPESP – Processo

97/07645-2), foco de 0.8 mm e potência de 4 Watts, em modo contínuo e sem contato (fig. 3c).

**GRUPO Nd:YAG:** seguiu-se a mesma seqüência dos procedimentos pré-operatórios do grupo BC, a remoção da lesão foi realizada utilizando-se aparelho emissor de radiação laser de Nd:YAG Pulse Máster 600IQ® (Dental Laser System, American Dental Technologies Inc. Michigan, USA), 30 Hz, 200 mJ/Hz e potência de 6 Watts, entregue por meio de fibra óptica de 300 µm (0,3mm), em modo contínuo e com contato (fig. 3d).



**FIGURA 3:** Aspecto clínico dos quatro grupos experimentais imediatamente após exérese da lesão: grupo bisturi convencional **(a)**; grupo bisturi elétrico **(b)**; grupo radiação laser de CO<sub>2</sub> **(c)**; grupo radiação laser de Nd:YAG **(d)**. Fonte: Elaborado pelo autor (2008).

As cirurgias propostas a cada grupo foram realizadas no mesmo dia e pelo mesmo profissional.

Durante os procedimentos foram seguidas as medidas de segurança para utilização dos aparelhos, ressaltando o uso de óculos de proteção, luvas para o operador e demais pessoas envolvidas diretamente no ato de irradiação, além de aspiração constante da “nuvem de fumaça” (Surgifresh – Texas, E.U.A.).

Foram realizados os seguintes cuidados pós-operatórios:

1. Terapêutica medicamentosa: Nas primeiras 24 horas foi realizada administração de droga analgésica, por via oral, aos animais, cuja concentração foi de 200 mg/ml de paracetamol administradas na dose de 0,15 mg/Kg por meio de 07 gotas/300 ml da água *ad libitum*.

2. Distribuição dos animais em gaiolas: Os animais foram distribuídos em gaiolas, identificados os quatro grupos experimentais, permanecendo, no máximo, cinco animais em cada gaiola.

#### **4.6 Períodos de Observação**

Decorridos sete, 14, 21 e 28 dias de pós-operatório, foi realizada eutanásia, por overdose do anestésico utilizado, a cinco animais de cada grupo. As peças anatômicas foram removidas em bloco, fixadas em formol a 10% por 72 horas, submetidas ao processamento histológico de rotina e, posteriormente, foram realizadas as análises histomorfológica e estatística da histomorfometria.

#### **4.7 Análise Clínica**

Os sinais clínicos da região tratada em língua, tais como: coloração, textura, presença de sangramento e/ou úlceras, presença ou não de sinais infecciosos e

inflamatórios foram documentados com o auxílio de uma máquina fotográfica (DENTAL EYE II, Yashica, Kyocera Corp., Tóquio, Japão) durante todos os períodos de observação dos grupos estudados.

## **4.8 Análise Histomorfológica e Histomorfométrica**

### **4.8.1 Preparo dos Espécimes para a Análise Histomorfológica e Histomorfométrica**

As peças foram processadas e incluídas em parafina. Nesta, foram realizados cortes semi-seriados em um micrótomo (Leica RM2255, Nussloch GmbH), no sentido transversal, com 5  $\mu\text{m}$  de espessura, dos quais obtiveram-se 10 lâminas, com aproximadamente seis cortes cada, as mesmas foram coradas com a técnica hematoxilina-eosina (HE) e analisadas por microscopia de luz.

### **4.8.2 Análise Histomorfológica**

Por meio das lâminas obtidas foi realizada a descrição do aspecto histomorfológico das peças cirúrgicas, levando-se em consideração a evolução do processo de reparação tecidual, as células envolvidas e as fibras musculares esqueléticas. As lâminas foram analisadas por um microscópio de luz (Axioskop 40®, Carl Zeiss, Alemanha) sendo utilizadas as objetivas 5x, 10x, 20x e 40x/0,63 (ACHROPLAN®, Carl Zeiss) e a ocular 10x (W-PI, Carl Zeiss).

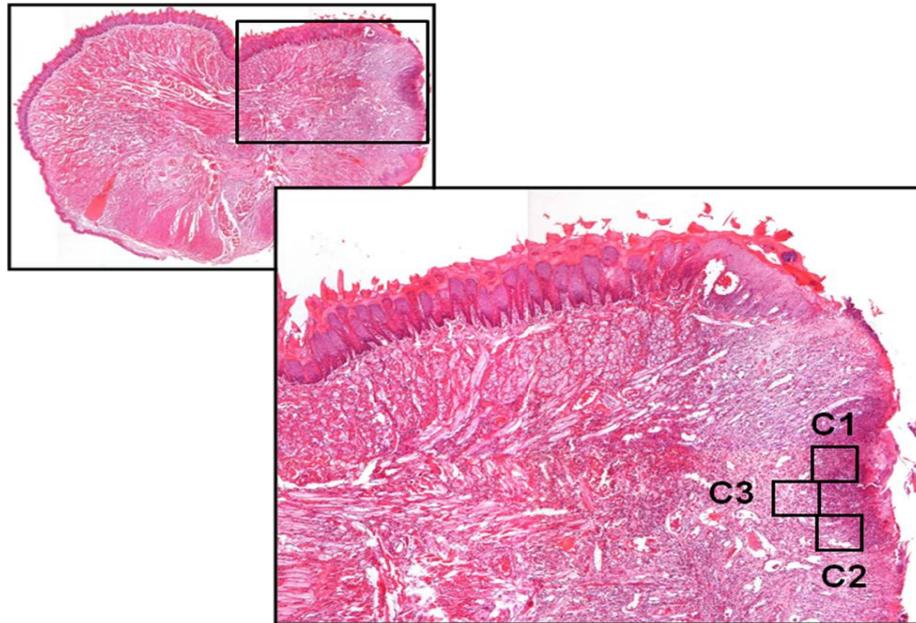
#### 4.8.3 Análise Histomorfométrica

Para a realização da análise histomorfométrica, foi utilizado o método estereológico (GOMES et al., 2002) que consiste em determinar parâmetros quantitativos tridimensionais de estruturas anatômicas a partir de cortes histológicos através da geometria e estatística. Os métodos estereológicos se baseiam em princípios geométrico-estatísticos, derivados da probabilidade de que as imagens dos perfis da estrutura na secção histológica coincidam com um sistema-teste apropriado. Deste modo, a característica principal nesses métodos está na casualização das amostras, eliminando a ocorrência de vício na amostragem. Esse método é realizado por meio da aplicação de procedimentos de escolha aleatória em todos os estágios do experimento, tais como: seleção dos animais, dos blocos histológicos, das lâminas histológicas, dos cortes e dos campos microscópicos.

A partir das 10 lâminas obtidas, três foram separadas para análise histomorfométrica.

Para o procedimento de histomorfometria da densidade das fibras musculares esqueléticas, a partir das três lâminas separadas, em cada uma, foram captados três campos histológicos subjacentes à área da exérese da lesão (C1, C2, C3) (fig. 4), sendo adquiridas imagens de 9 campos por animal, totalizando 720 campos, os quais foram quantificados (área de cada campo histológico equivale a  $14.275,18 \mu\text{m}^2$ ). Todos os campos histológicos foram captados por um sistema digital composto por um microscópio de luz (Axioskop 40®, Carl Zeiss, Alemanha) sendo utilizada a objetiva 40x/0,63 (ACHROPLAN®, Carl Zeiss) e a ocular 10x (W-PI, Carl Zeiss) e por uma câmera digital (AxioCam MR5®, Carl Zeiss, Alemanha) conectada a um computador (Fujitsu Siemens computers®, Intel®, Windows XP Professional®) com programa digital *AxioVision Release 4.6®* (Carl Zeiss, Alemanha, versão 2007) instalados no laboratório de Histomorfometria e Informática do CEBAPE/ Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - UNESP. As imagens foram adquiridas em formato *Zeiss Vision Image (zvi)*. Este programa permitiu delimitar e quantificar, em *pixels*, a densidade das fibras musculares esqueléticas selecionadas, utilizando-se ferramenta própria do programa, sendo as

áreas identificadas e quantificadas automaticamente, cujo resultado foi expresso em  $\mu\text{m}^2$ .



**FIGURA 4** - Localização dos campos utilizados para quantificação das fibras musculares esqueléticas (C1, C2 e C3). Aumento original 50x. Fonte: Elaborado pelo autor (2008).

#### 4.9 Análise Estatística dos Resultados

Os dados obtidos por meio da histomorfometria das fibras musculares esqueléticas ( $\mu\text{m}^2$ ) foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Comparações Múltiplas de Tukey (GraphPad Prisma® versão 4.02, *GraphPad Software*, San Diego, California, USA). Foram considerados estatisticamente significantes os valores de  $p$  menores que 0,05 ( $*p < 0,05$ ).

RESULTADOS



## 5 RESULTADOS

### 5.1 Análise Clínica

Os achados clínicos mais freqüentes observados nos espécimes foram analisados em conjunto dentro de cada período considerado no experimento.

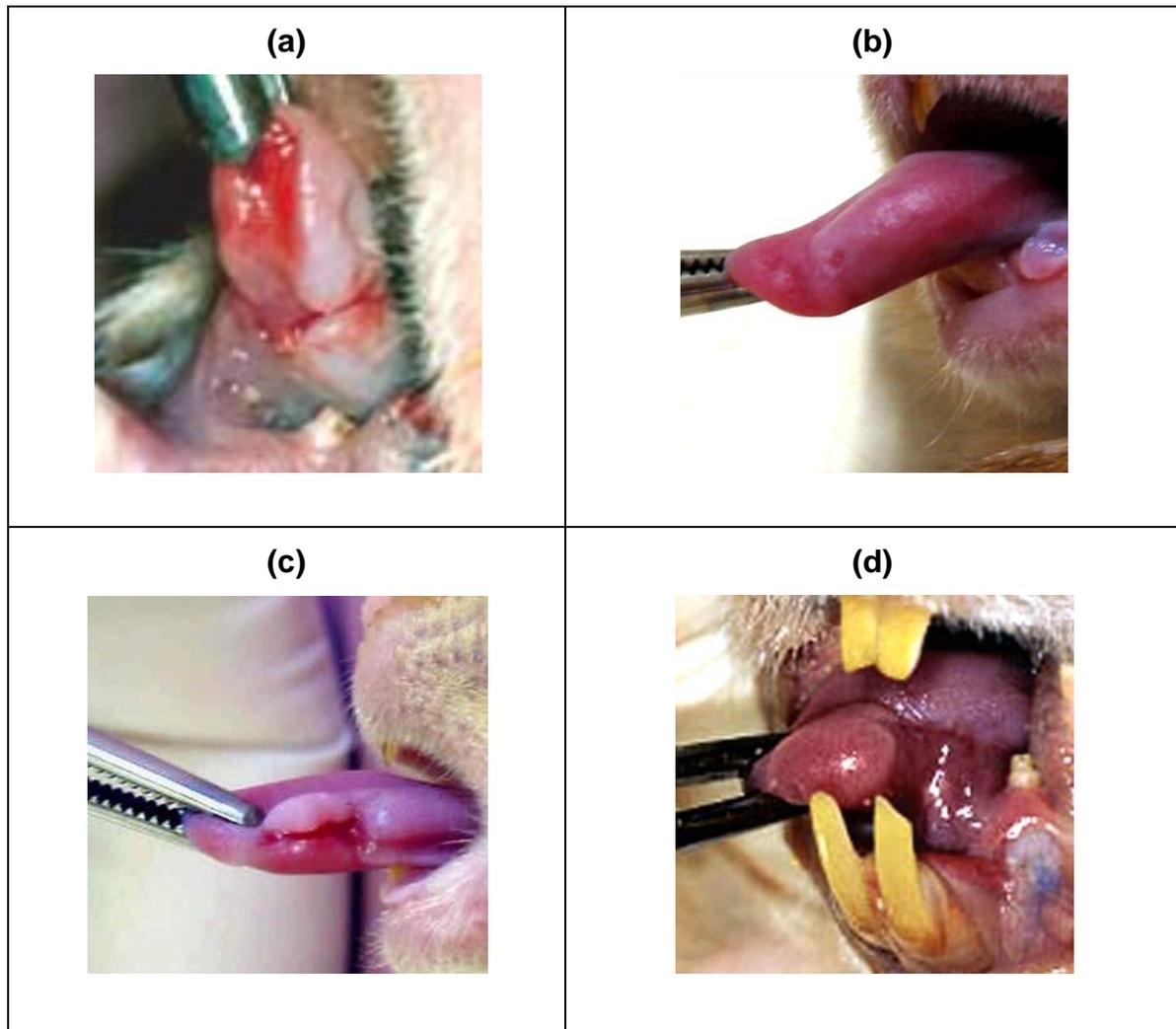
#### 5.1.1 Pós-operatório de Sete Dias

No grupo **BC** observou-se área de reparação com aspecto hiperemiado, superfície irregular no local da sutura e aparente início de formação cicatricial. Foi observado, ainda, discreto sangramento devido a remoção da sutura (fig. 5a).

A área de reparação tecidual no grupo **BE** mostrou ausência de sangramento e com visível contração da ferida (fig.5b).

No grupo radiação laser de **CO<sub>2</sub>** verificou-se presença de úlcera na superfície da área irradiada (fig. 5c). O grupo radiação laser de **Nd:YAG** apresentou aspecto de normalidade em relação à coloração e à textura da superfície da área tratada (fig. 5d).

Foi observada presença de edema nos espécimes dos quatro grupos experimentais.



**FIGURA 5** – Aspecto clínico da região da língua no período pós-operatório de sete dias dos grupos: BC **(a)**, BE **(b)**, radiação laser de CO<sub>2</sub> **(c)** e radiação laser de Nd:YAG **(d)**. Fonte: Elaborado pelo autor (2008).

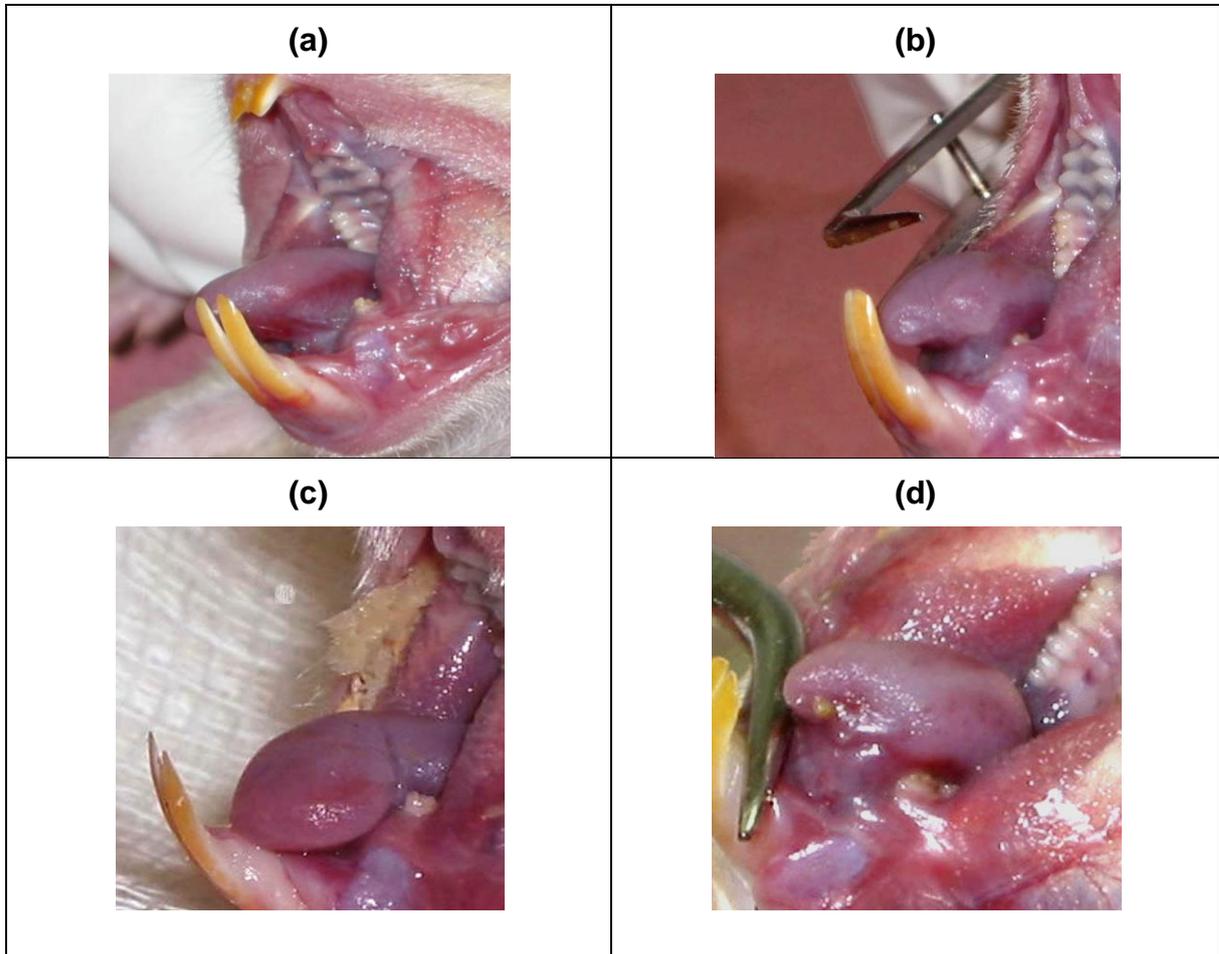
### 5.1.2 Pós-operatório de 14 Dias

No grupo **BC** a área da reparação se mostrou com aspecto de normalidade. Entretanto, em alguns animais observou-se discreto sangramento (fig. 6a).

Notou-se retração da ferida pós-operatória no grupo **BE**, porém a mucosa mostrou-se com textura e coloração normais (fig. 6b).

No grupo radiação laser de **CO<sub>2</sub>** a superfície da área vaporizada mostrou-se com aspecto de normalidade em relação à textura e coloração (fig. 6c). Em alguns

espécimes do grupo radiação laser de **Nd:YAG** foi observada área de depressão tecidual na região central da área tratada (fig. 6d).

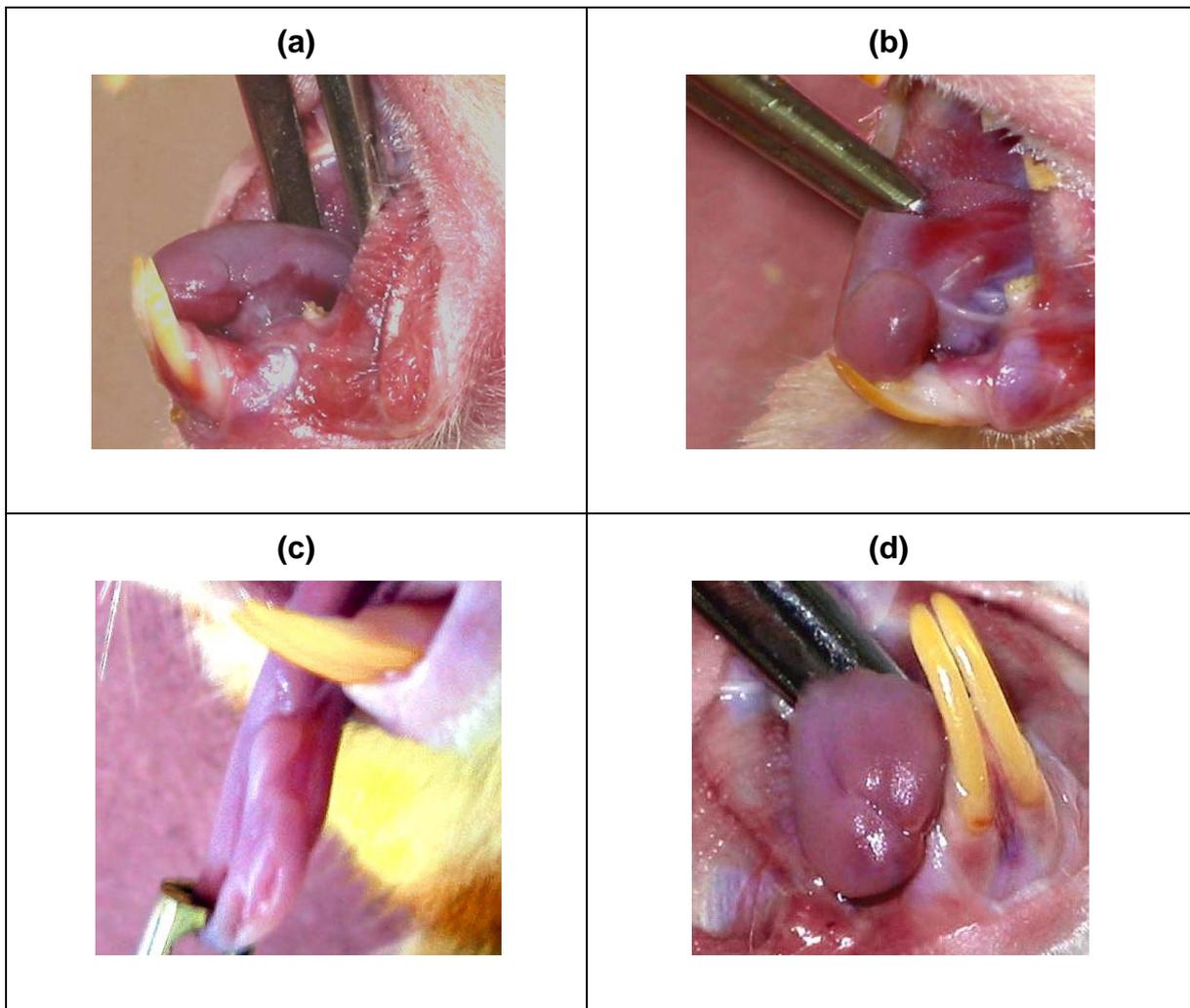


**FIGURA 6** – Aspecto clínico da região da língua no período pós-operatório de 14 dias dos grupos: BC **(a)**, BE **(b)**, radiação laser de CO<sub>2</sub> **(c)** e radiação laser de Nd:YAG **(d)**. Fonte: Elaborado pelo autor (2008).

### 5.1.3 Pós-operatório de 21 Dias

Nos grupos **BC** e **BE** a área tratada apresentou-se com coloração normal em toda a sua extensão (figs. 7a e 7b, respectivamente). Em ambos os grupos foi observada perda significativa de tecido lingual.

A reparação tecidual na área vaporizada nos grupos radiação laser de **CO<sub>2</sub>** e de **Nd:YAG** mostrou-se com aspecto e coloração normais (figs. 7c e 7d, respectivamente). Em ambos os grupos foi observada perda significativa de tecido lingual.



**FIGURA 7** – Aspecto clínico da região da língua no período pós-operatório de 21 dias dos grupos: BC **(a)**, BE **(b)**, radiação laser de CO<sub>2</sub> **(c)** e radiação laser de Nd:YAG **(d)**. Fonte: Elaborado pelo autor (2008).

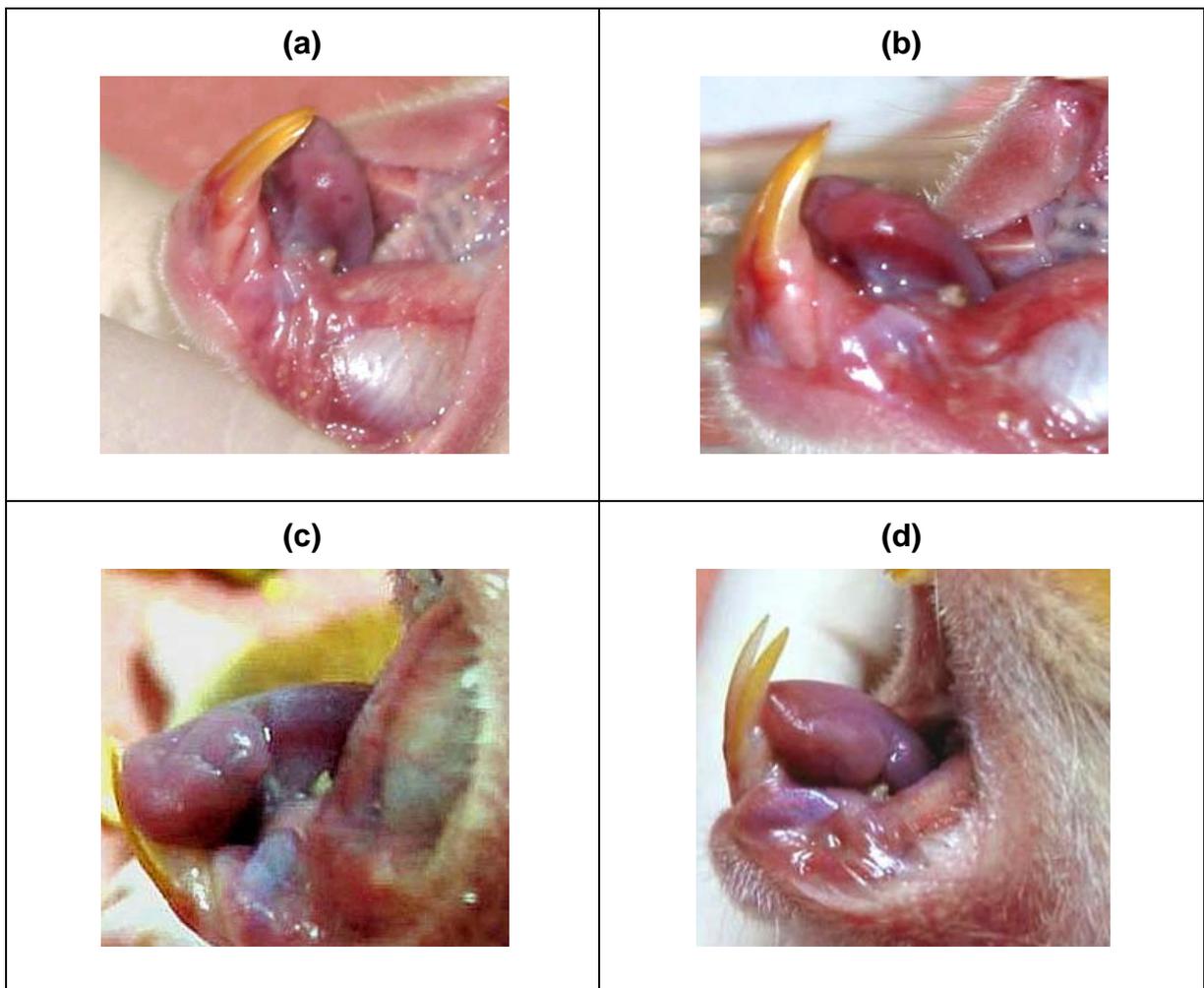
#### 5.1.4 Pós-operatório de 28 Dias

Nos grupos **BC** e **BE** a área tratada mostrou-se totalmente reparada, porém, no primeiro, evidenciou-se pequena formação cicatricial, sobretudo na região de sutura.

Em ambos os grupos, a superfície da área de reparação apresentou-se com aspecto liso e brilhante e com coloração rósea; verificou-se, ainda, discreta presença de papilas linguais na superfície dorsal (figs. 8a e 8b, respectivamente).

Tanto no grupo radiação laser de **CO<sub>2</sub>**, quanto no radiação laser de **Nd:YAG** a área vaporizada mostrou-se completamente reparada (figs. 8c e 8d, respectivamente). O atraso na reparação observado nos períodos anteriores, quando comparado ao grupo bisturi convencional, mostrou-se sem significância clínica. Entretanto, no grupo radiação laser de **Nd: YAG** foi observada pequena depressão central na área vaporizada.

Apesar da perda tecidual significativa observada na língua de todos os espécimes dos grupos experimentais, não foi constatado comprometimento funcional.

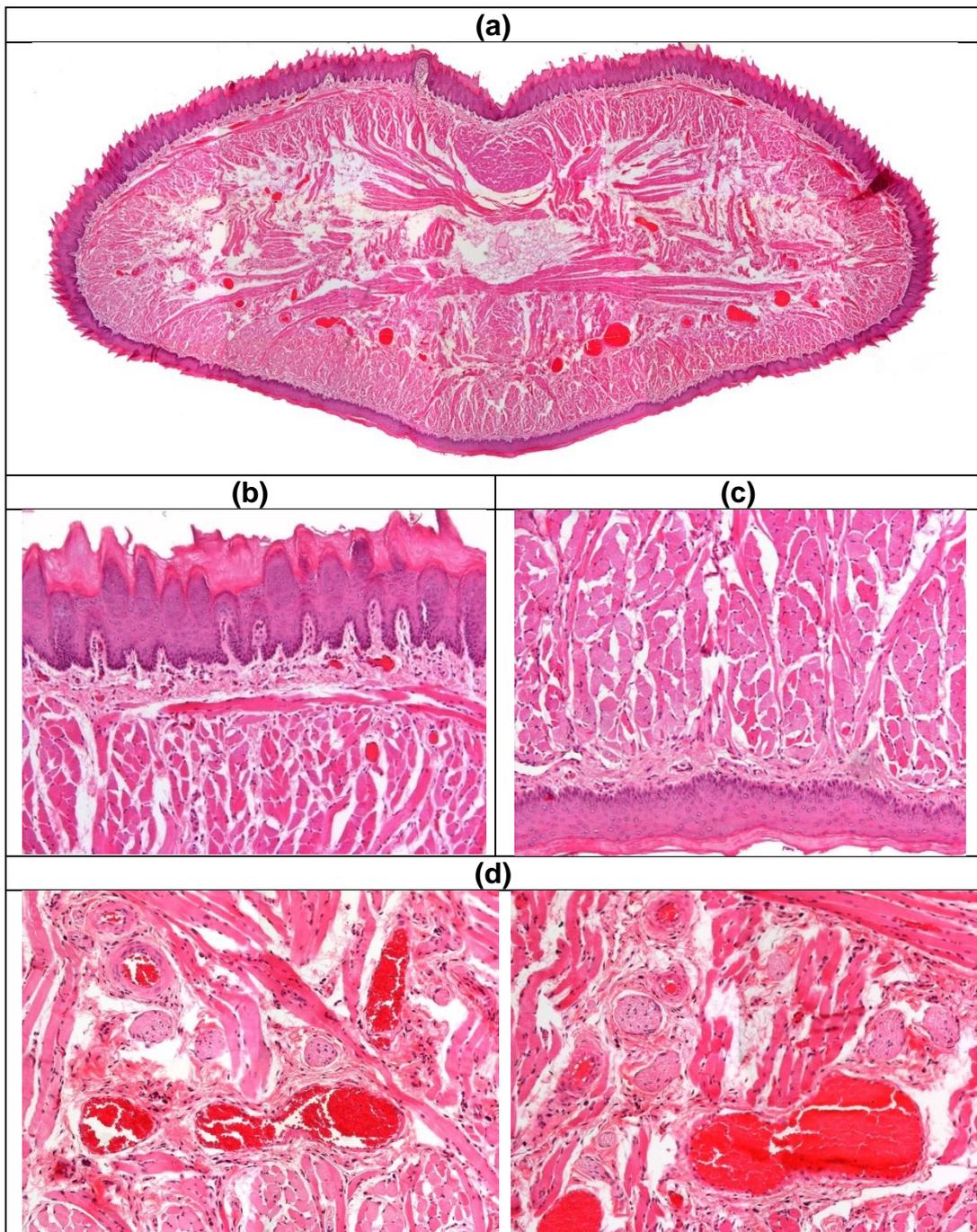


**FIGURA 8** – Aspecto clínico da região da língua no período pós-operatório de 28 dias dos grupos: BC **(a)**, BE **(b)**, radiação laser de CO<sub>2</sub> **(c)** e radiação laser de Nd:YAG **(d)**. Fonte: Elaborado pelo autor (2008).

## 5.2 Análise Histomorfológica

### 5.2.1 Língua Normal

Na análise histomorfológica de um corte transversal de fragmento da língua normal de hamster, em nível de terço médio, foram considerados três aspectos histológicos, compostos por mucosa bucal (epitélio e lâmina própria), plano muscular e, eventualmente, tecido glandular. O fragmento mostrou-se revestido por epitélio pavimentoso estratificado ortoqueratinizado com a camada de queratina bem desenvolvida, principalmente em sua superfície superior ou dorsal. Nesta superfície, observou-se presença de inúmeras papilas, predominantemente filiformes, definidas pela evaginação da mucosa na superfície dorsal. Verificou-se que a superfície inferior ou ventral apresentava-se lisa, exibindo epitélio delgado, composto por 5 a 6 camadas de células e, a sua camada basal, mostrou-se duplicada em algumas regiões. Detectou-se, também, que as projeções epiteliais da superfície ventral, em direção ao tecido conjuntivo, apresentaram-se mais curtas e largas, quando comparadas com o epitélio da superfície dorsal. A lâmina própria apresentou espessura fina e constituída por tecido conjuntivo frouxo, exibindo numerosos capilares sangüíneos de pequeno calibre, distribuídos aleatoriamente. Observou-se que a massa muscular era predominante e composta por feixes de fibras musculares esqueléticas, permeadas por feixes de fibras nervosas e vasos sangüíneos de médio e grande calibres, mais freqüentes na região ventral. Os feixes musculares encontravam-se dispostos perpendicularmente nas extremidades e, longitudinalmente, na porção mediana da língua (fig. 9).

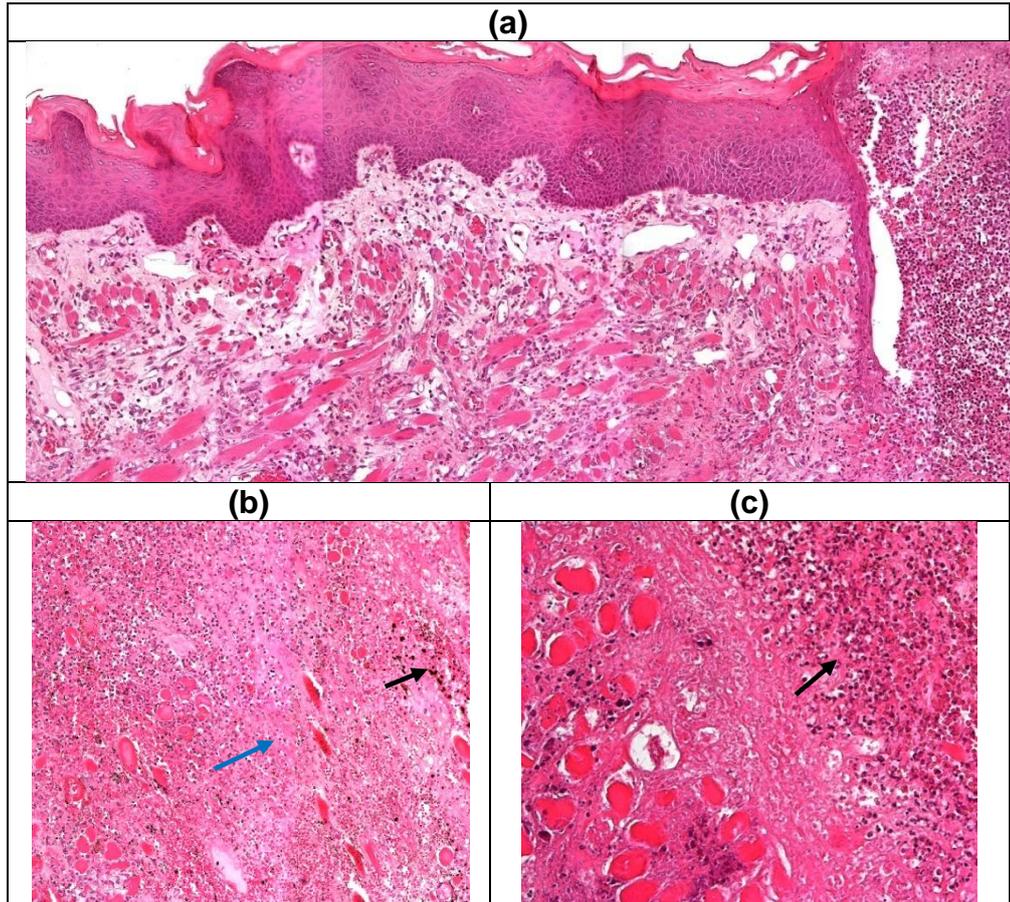


**FIGURA 9 – Língua normal.** Fotomicrografias exibindo imagem de corte transversal de fragmento de língua normal de hamster **(a)**; aspecto do epitélio pavimentoso estratificado ortoqueratinizado da superfície superior ou dorsal **(b)** e inferior ou ventral **(c)**; vasos sanguíneos de grande calibre e feixes nervosos, localizados na região ventral da língua **(d)**. [H.E., aumento original: 50x, 100x e 200x]. Fonte: UNESP/ FOSJC (2008).

### 5.2.2 Língua Lesada – Oleato de Monoetanolamina 5% (Ethamolin<sup>®</sup>)

O fragmento de língua, decorridos três dias da administração do oleato de monoetanolamina 5% (Ethamolin<sup>®</sup>), apresentou extensas áreas de necrose do tipo coagulação, tanto na profundidade quanto na extremidade. Além disso, verificou-se a presença de colônias bacterianas, principalmente, na superfície da lesão, bem como a substituição do tecido muscular por tecido conjuntivo, intensamente celularizado e vascularizado e, também, tecido de granulação. A porção central mostrou-se mais comprometida do que a periferia e se observou presença de intenso infiltrado de células inflamatórias, predominantemente, polimorfonucleares, bem como intensa vascularização e áreas difusas de hemorragia intersticial. O revestimento epitelial mostrou-se descontínuo e exibia epitélio paraqueratinizado com acantose, espongirose e degeneração hidrópica em algumas regiões, tendo sido evidenciados, também, pigmentos de hemossiderina (fig. 10).

Os achados histológicos mais freqüentes observados nos espécimes foram analisados em conjunto dentro de cada período considerado no experimento. Na descrição dos achados microscópicos, procurou-se ressaltar as diferenças entre os grupos **BC**, **BE**, **CO<sub>2</sub>** e **Nd:YAG**.

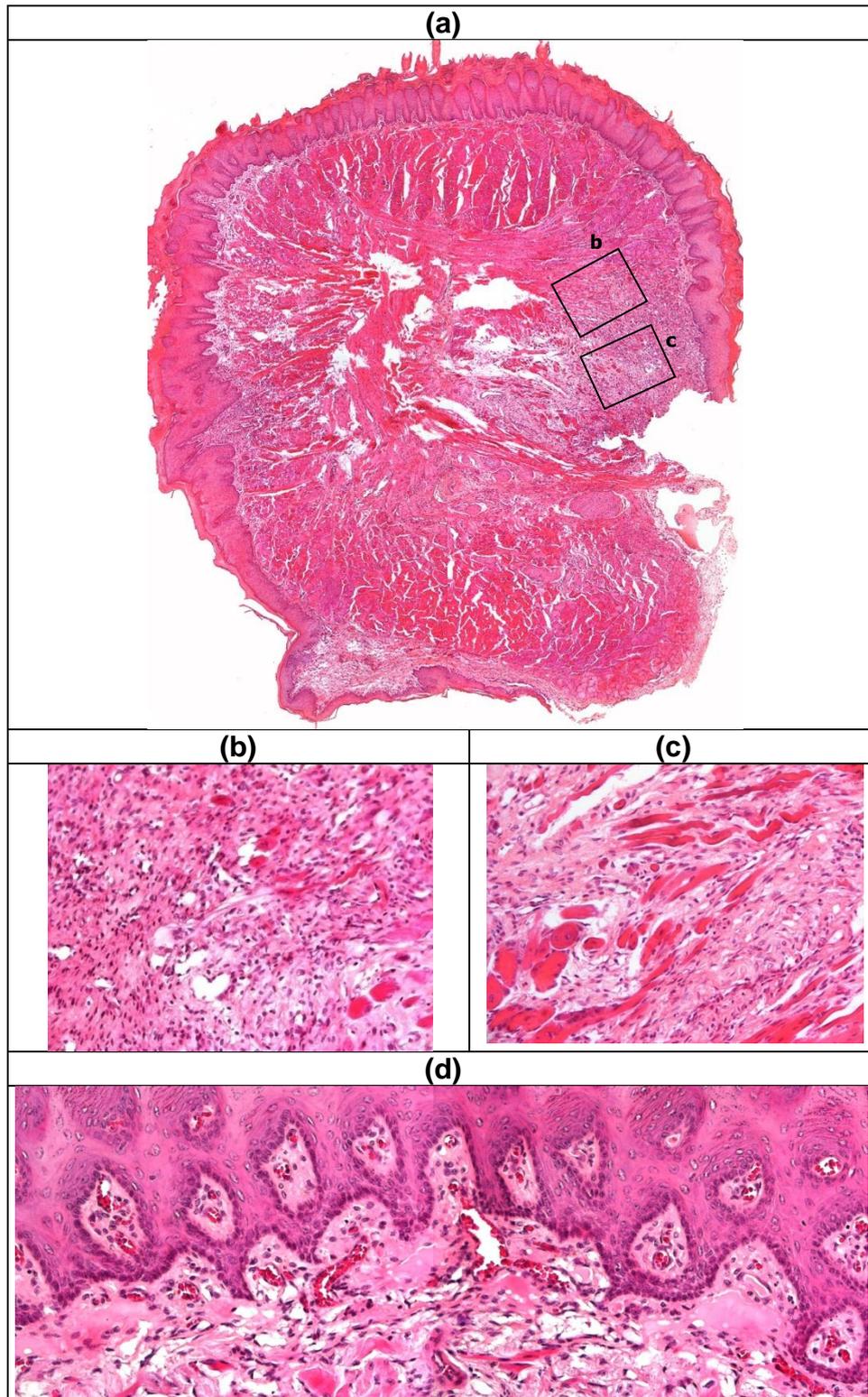


**FIGURA 10** – Fotomicrografias exibindo imagem de corte transversal de fragmento de língua com lesão provocada pelo oleato de monoetanolamina (Ethamolin<sup>®</sup>). Substituição de tecido muscular por tecido conjuntivo bem celularizado com intenso infiltrado inflamatório; extensa solução de continuidade e remanescentes de fibras musculares permeadas por tecido conjuntivo **(a)**; extensas áreas de necrose tecidual do tipo coagulação (seta azul) e pigmentos de hemossiderina (setas pretas) na porção mediana do fragmento **(b e c)**. [H.E., aumento original: 100x e 200x]. Fonte: UNESP/FOSJC (2008).

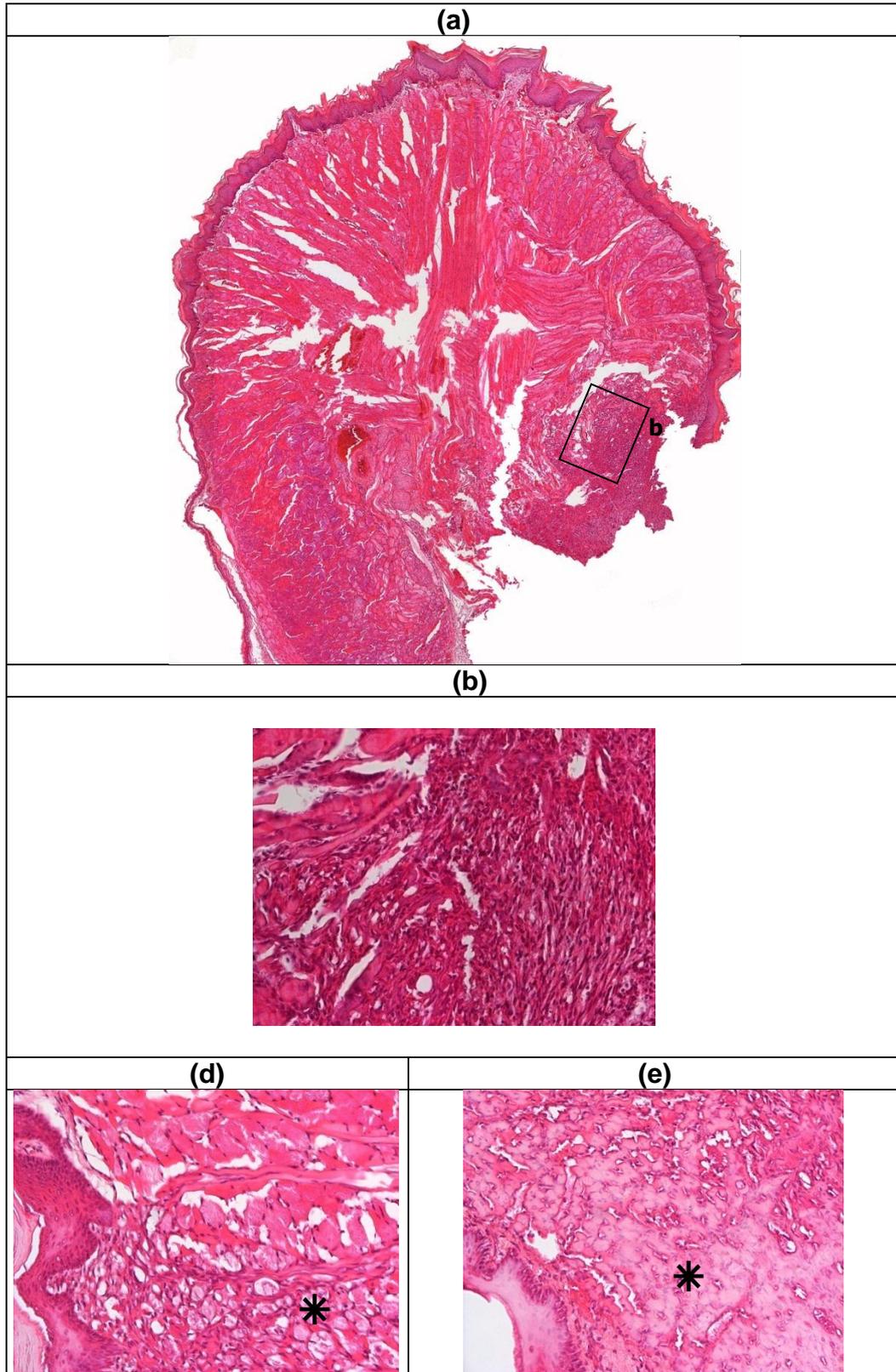
### 5.2.3 Pós-operatório de Sete Dias

**Grupo BC:** Neste grupo observou-se a ocorrência de perdas teciduais e, conseqüentemente, a alteração na histomorfologia da estrutura original. Em algumas regiões, verificou-se a substituição de tecido muscular por tecido conjuntivo na porção mediana do fragmento, que se mostrou ricamente celularizado e vascularizado, tendo sido evidenciado, também, intenso infiltrado de células inflamatórias, predominantemente, mononucleares. Além disso, constatou-se a perda de continuidade do revestimento epitelial, bem como necrose tecidual na superfície do fragmento. Verificou-se que os feixes de fibras musculares encontravam-se organizados, assim como havia boa preservação de feixes nervosos. A lâmina própria apresentou numerosos vasos sangüíneos congestos, de pequeno e médio calibre, também, edema e infiltrado de células inflamatórias mononucleares (fig. 11).

**Grupo BE:** Na análise deste grupo, observou-se que houve perda significativa de tecidos e, conseqüentemente, a alteração morfológica da língua. Na área de exérese, notou-se tecido necrótico, do tipo coagulação e, na subjacente, substituição de tecido muscular por tecido conjuntivo bem celularizado e, ainda, por extensas áreas de aspecto hialino em alguns cortes histológicos. O tecido conjuntivo mostrou-se desorganizado, ricamente celularizado e vascularizado, tendo apresentado intenso infiltrado de células inflamatórias, predominantemente, mononucleares. Nesta mesma região, verificou-se a presença de fibras musculares em processo de degeneração, localizadas nas adjacências das áreas hialinas. Em algumas regiões, notou-se o aumento da espessura da lâmina própria, bem como degeneração hidrópica e exocitose. Em alguns animais, os feixes nervosos, arteríolas e vênulas, localizados principalmente na face ventral da língua, apresentaram-se íntegros (fig. 12).



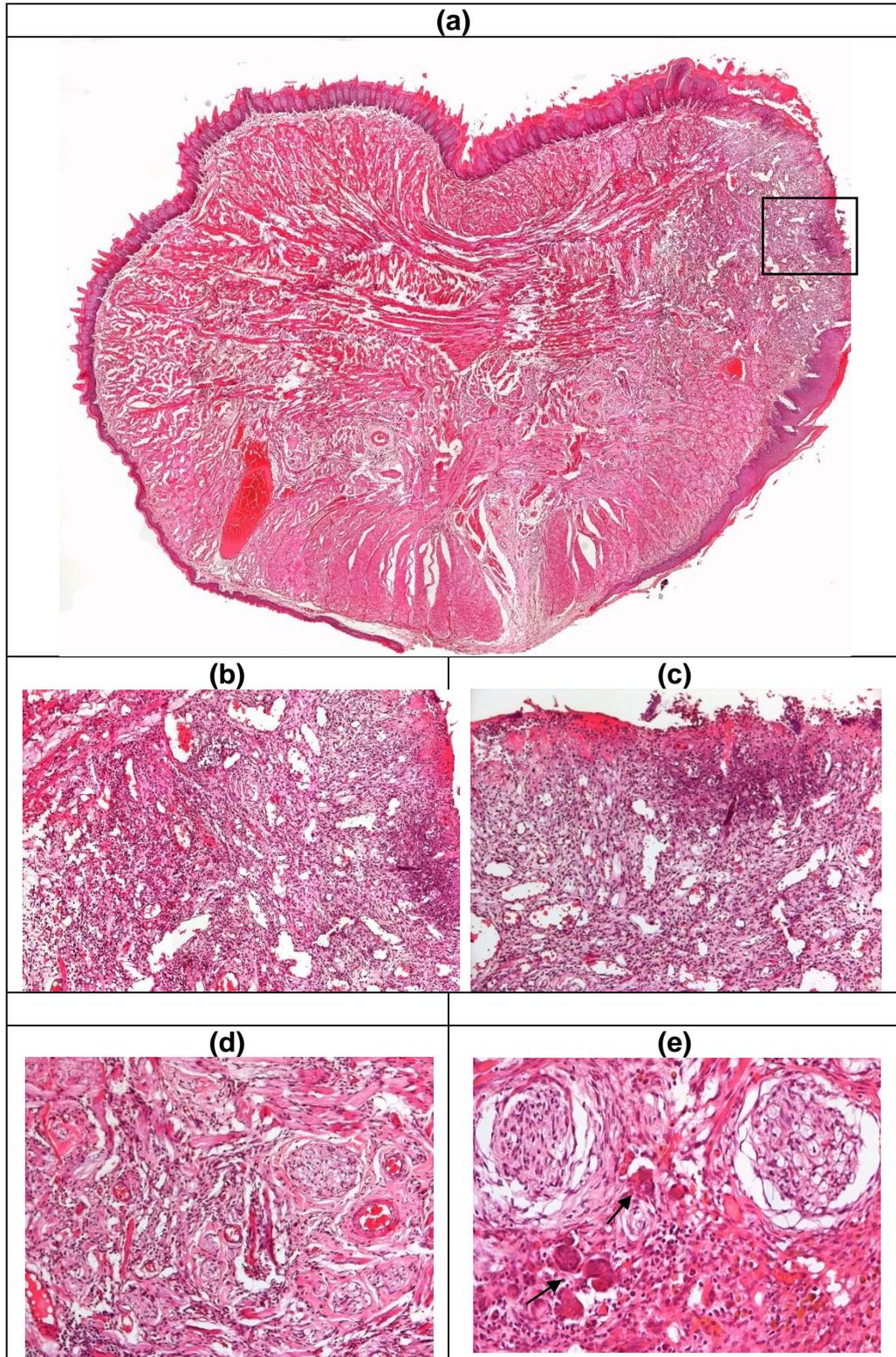
**FIGURA 11 – Grupo BC. Sete dias pós-operatório.** Fotomicrografias exibindo imagem de corte transversal de fragmento de língua tratada com bisturi convencional (a); fibras musculares esqueléticas isoladas permeadas por tecido conjuntivo bem celularizado (b); intensa vascularização na extensão da lâmina própria (c) e vasos sanguíneos congestionados de diferentes calibres subjacentes ao epitélio (d). [H.E., aumento original: 50x, 100x e 200x]. Fonte: UNESP/ FOSJC (2008).



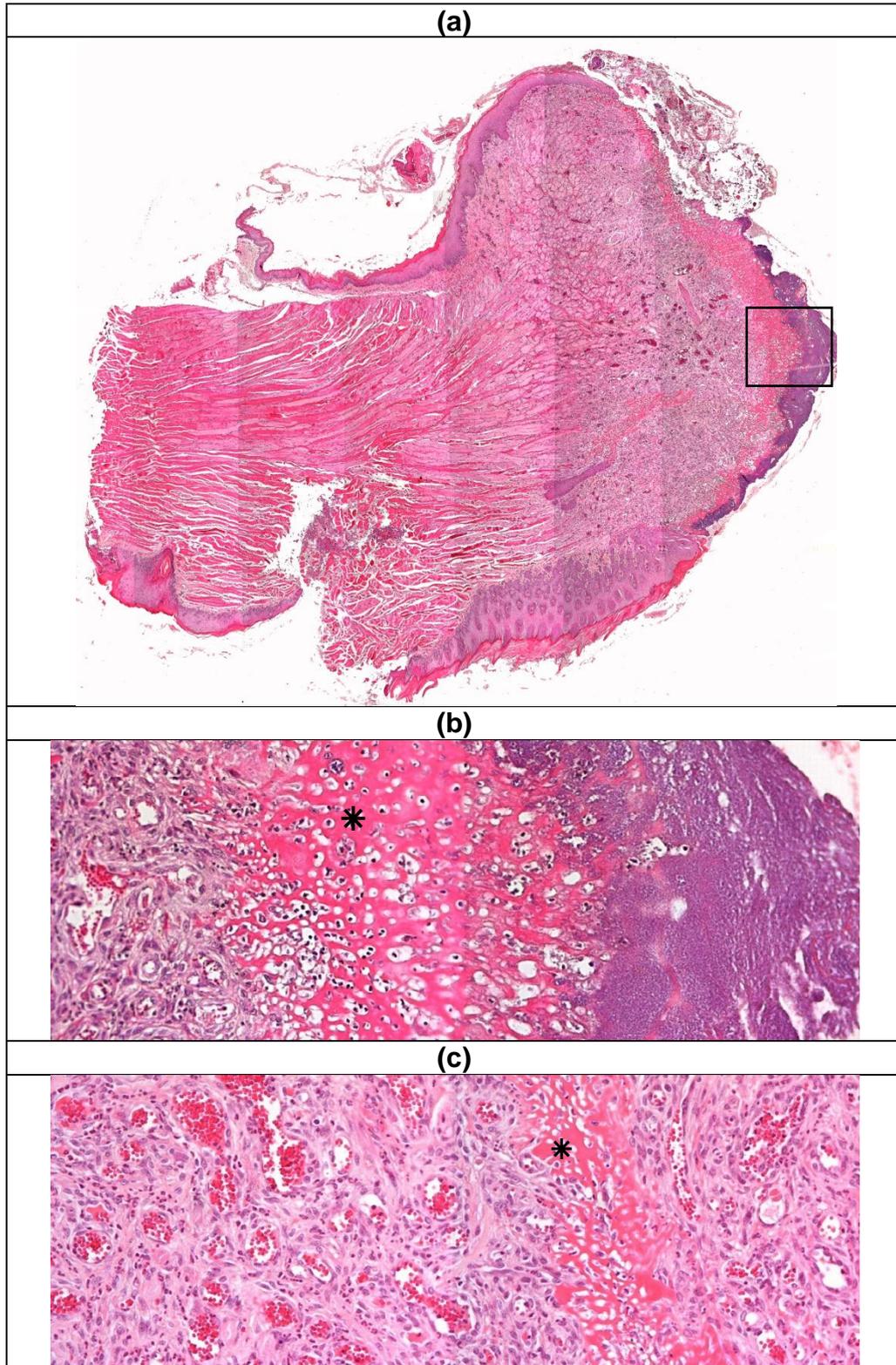
**FIGURA 12 – Grupo BE. Sete dias pós-operatório.** Fotomicrografias exibindo imagem de corte transversal de fragmento de língua tratada com bisturi elétrico **(a)**; substituição do tecido muscular por tecido conjuntivo frouxo ricamente celularizado e vascularizado **(b)**; fibras musculares em processo de degeneração (\*) **(c)**; extensas áreas de hialinização (\*) **(e)**. [H.E., aumento original: 50x, 200x e 400x]. Fonte: UNESP/ FOSJC (2008).

**Grupo CO<sub>2</sub>:** Verificou-se perda morfológica da língua. Na região da exérese, extensa área ulcerada e recoberta por membrana serofibrinosa, associada ou não a colônias bacterianas. O epitélio de revestimento, adjacente à lesão, exibiu acantose, degeneração hidrópica e exocitose. Subjacente a esta região, evidenciou-se tecido conjuntivo ricamente celular e organizado, que mostrou numerosos vasos sangüíneos congestos de médio a grande calibres, difusamente distribuídos. Além disso, observou-se intenso infiltrado de células inflamatórias polimorfonucleares e mononucleares na superfície e em região profunda do fragmento, respectivamente. Células gigantes foram também observadas, principalmente, nas adjacências dos pigmentos de hemossiderina. Este tecido estendeu-se da extremidade para a porção mediana, substituindo o tecido muscular pré-existente. Em algumas áreas, ocorreu a presença de fibras musculares esqueléticas em processo de degeneração. Focos de áreas hialinas e feixes nervosos preservados completaram o quadro histológico (fig. 13).

**Grupo Nd:YAG:** Neste grupo, observou-se perda significativa da arquitetura morfológica da língua. Encontrou-se extensa área ulcerada em uma das extremidades do fragmento, a qual estava totalmente recoberta por uma espessa camada de material amorfo, de aspecto hialino, promovendo um efeito de barreira biológica. Em alguns animais, notou-se uma variação na quantidade de colônias bacterianas na superfície do fragmento. Este material também foi localizado nas adjacências da superfície e se encontrava permeado por tecido conjuntivo do tipo reacional. Verificou-se, também, substituição do tecido muscular por tecido conjuntivo frouxo, bem celularizado e rico em vasos sangüíneos congestos e, ainda, a presença de fibras musculares em processo de degeneração localizadas nas áreas adjacentes deste tecido conjuntivo. Além disso, este tecido exibiu intenso infiltrado de células inflamatórias polimorfonucleares e mononucleares. Alguns feixes nervosos mostraram-se comprometidos com o processo inflamatório, porém não foram observados sinais significativos de degeneração desta estrutura. Nas áreas com solução de continuidade, principalmente próximas à região da lesão, notou-se que o epitélio apresentou acantose, alongamento das projeções epiteliais, degeneração hidrópica e exocitose (fig. 14).



**FIGURA 13 – Grupo CO<sub>2</sub>. Sete dias pós-operatório.** Fotomicrografias exibindo imagem de corte transversal de fragmento de língua tratada com radiação laser de CO<sub>2</sub> **(a)**; substituição do tecido muscular por tecido conjuntivo ricamente vascularizado e com severo infiltrado de células inflamatórias **(b)**; superfície ulcerada recoberta por membrana serofibrinosa **(c)**; preservação de feixes nervosos **(d)**; células gigantes multinucleadas (setas), próximas a áreas de pigmento de hemossiderina **(e)**. [H.E., aumento original: 50x, 100x, 200x e 400x]. Fonte: UNESP/ FOSJC (2008).

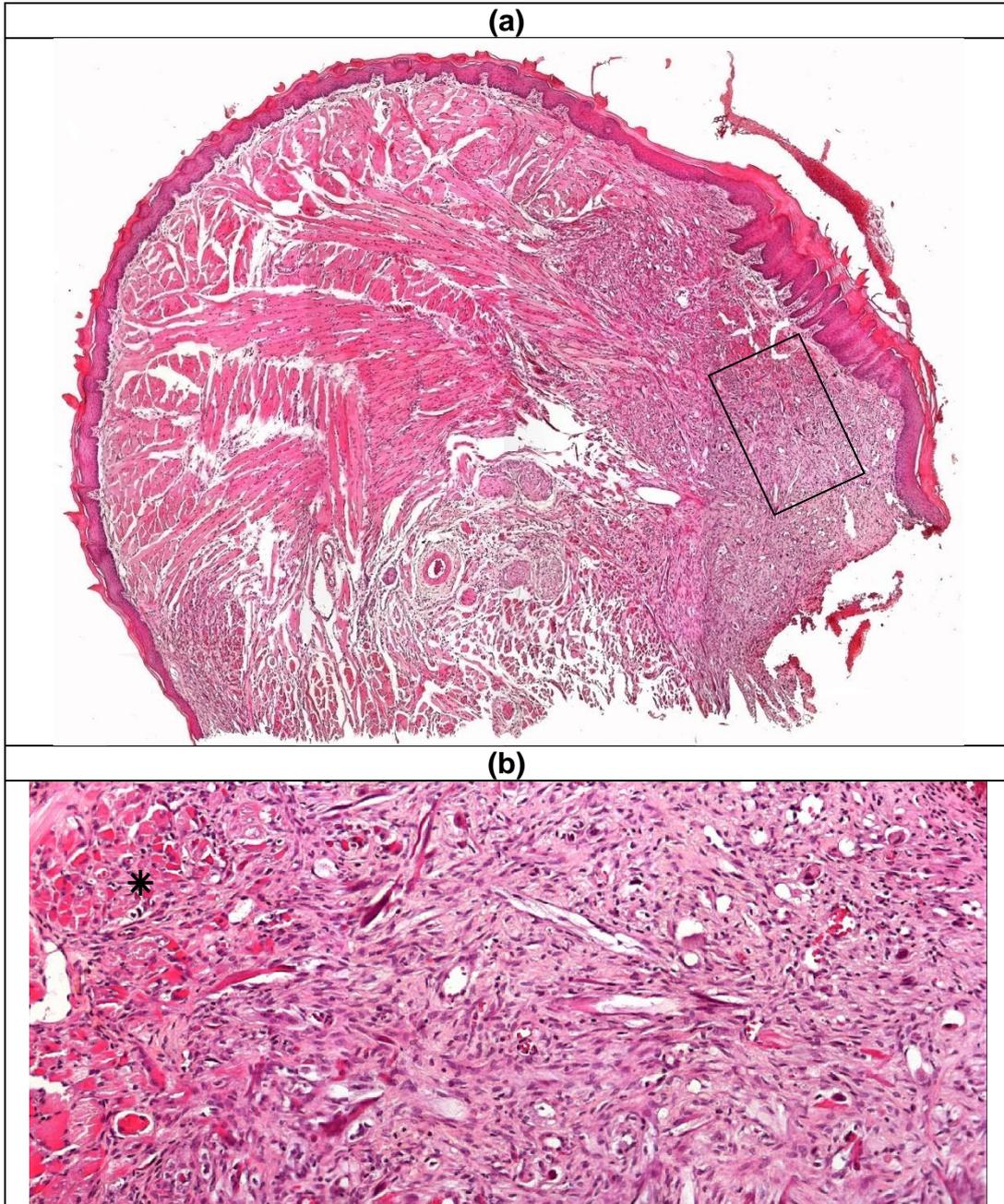


**FIGURA 14 – Grupo Nd:YAG. Sete dias pós-operatório.** Fotomicrografias exibindo imagem de corte transversal de fragmento de língua tratada com radiação laser de Nd:YAG **(a)**; superfície ulcerada recoberta por espessa camada de material amorfo de aspecto hialino (\*), associado a colônias bacterianas e células inflamatórias **(b)**; material hialino (\*) permeado por tecido conjuntivo frouxo com intensa vascularização e bem celularizado **(c)**. [H.E., aumento original: 50x e 200x]. Fonte: UNESP/ FOSJC (2008).

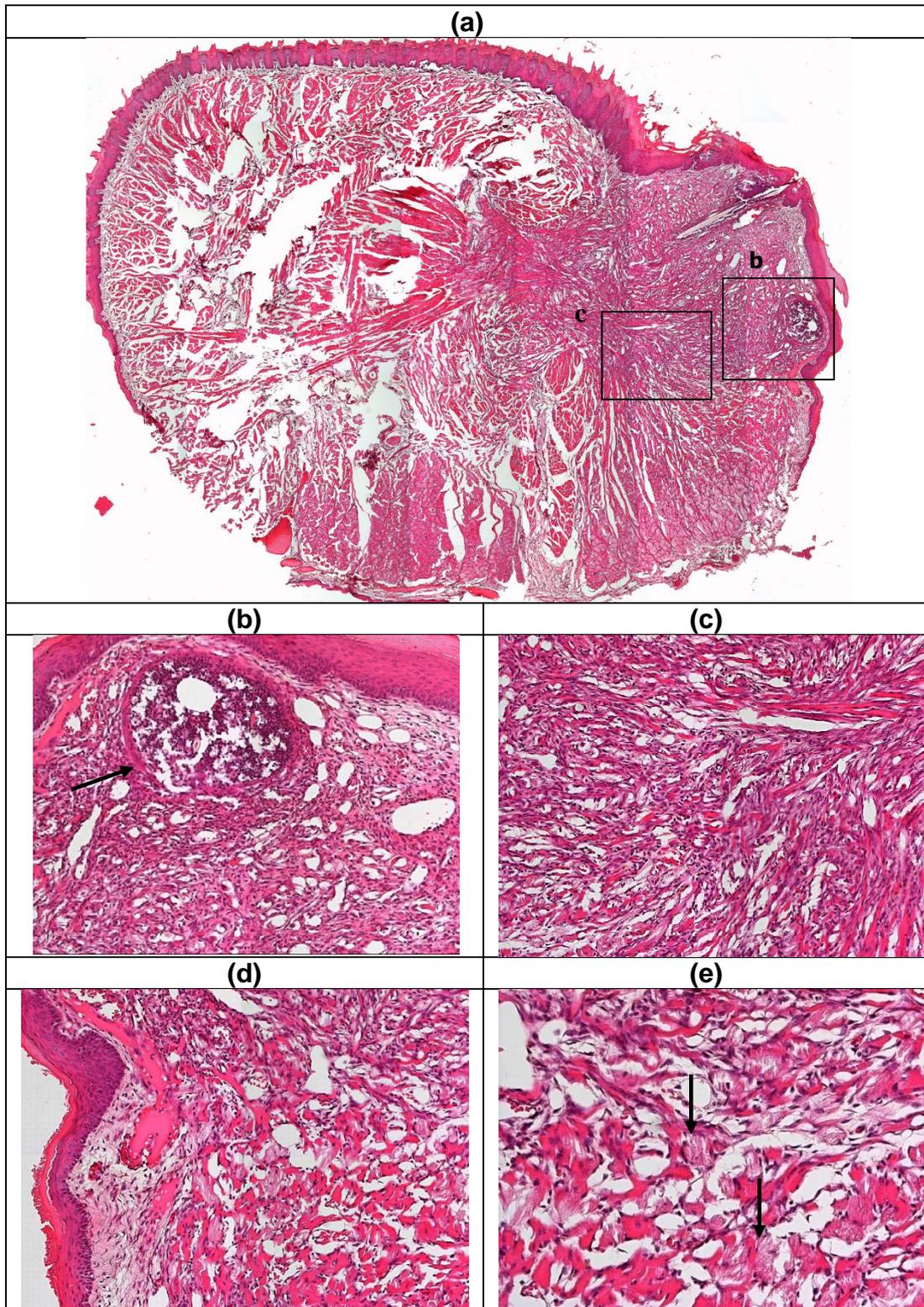
#### 5.2.4 Pós-operatório de 14 Dias

**Grupo BC:** O fragmento de língua mostrou tecido conjuntivo substituindo o tecido muscular pré-existente na área da exérese e se estendendo para a porção mediana desta estrutura. Neste período de análise, encontrou-se este tecido mais organizado, se comparado com o verificado no período anterior, pois apresentou intensa celularidade, numerosos vasos sangüíneos, bem como moderado infiltrado de células inflamatórias, predominantemente, mononucleares. Além disso, permeadas neste tecido, observaram-se fibras musculares neoformadas, atróficas, localizadas, principalmente, nas adjacências da porção mediana e distribuídas de forma desorganizada. Foi observada reepitelização na área lesada, porém sem evidência de formação de papilas linguais na superfície superior (dorsal) (fig. 16).

**Grupo BE:** Na região de exérese, o processo de reparação apresentou-se extenso. O tecido conjuntivo, substituindo o tecido muscular lesado, mostrou-se ricamente celular, com numerosos vasos sangüíneos, bem como apresentou focos de abscesso em alguns fragmentos. Observou-se que este tecido estava ainda desorganizado e permeado com alguns remanescentes de fibras musculares atróficas e em processo de degeneração. Áreas hialinas também foram evidenciadas nas adjacências da superfície. O epitélio neoformado na superfície superior apresentou ausência de papilas linguais. Além disso, houve repovoamento de fibras musculares, distribuídas aleatoriamente, em toda a região do processo de reparo, entretanto, estas fibras mostraram-se atróficas, com arranjos irregulares (fig. 17).



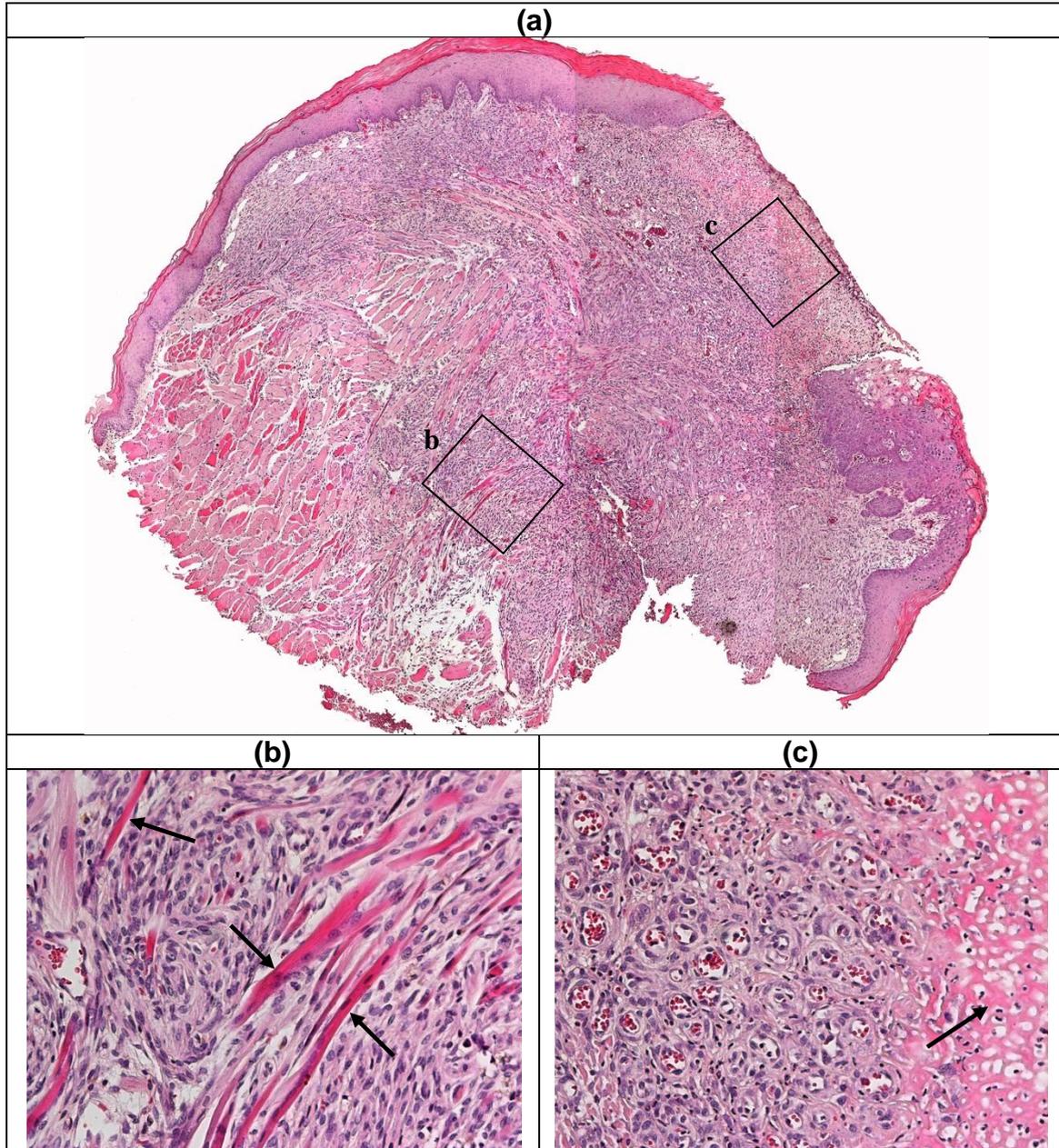
**FIGURA 15 – Grupo BC. 14 dias pós-operatório.** Fotomicrografias exibindo imagem de corte transversal de fragmento de língua tratada com bisturi convencional **(a)**; fibras musculares neoformadas permeadas por tecido conjuntivo (\*), bem celular e vascularizado **(b)**. [H.E., aumento original: 50x e 200x]. Fonte: UNESP/ FOSJC (2008).



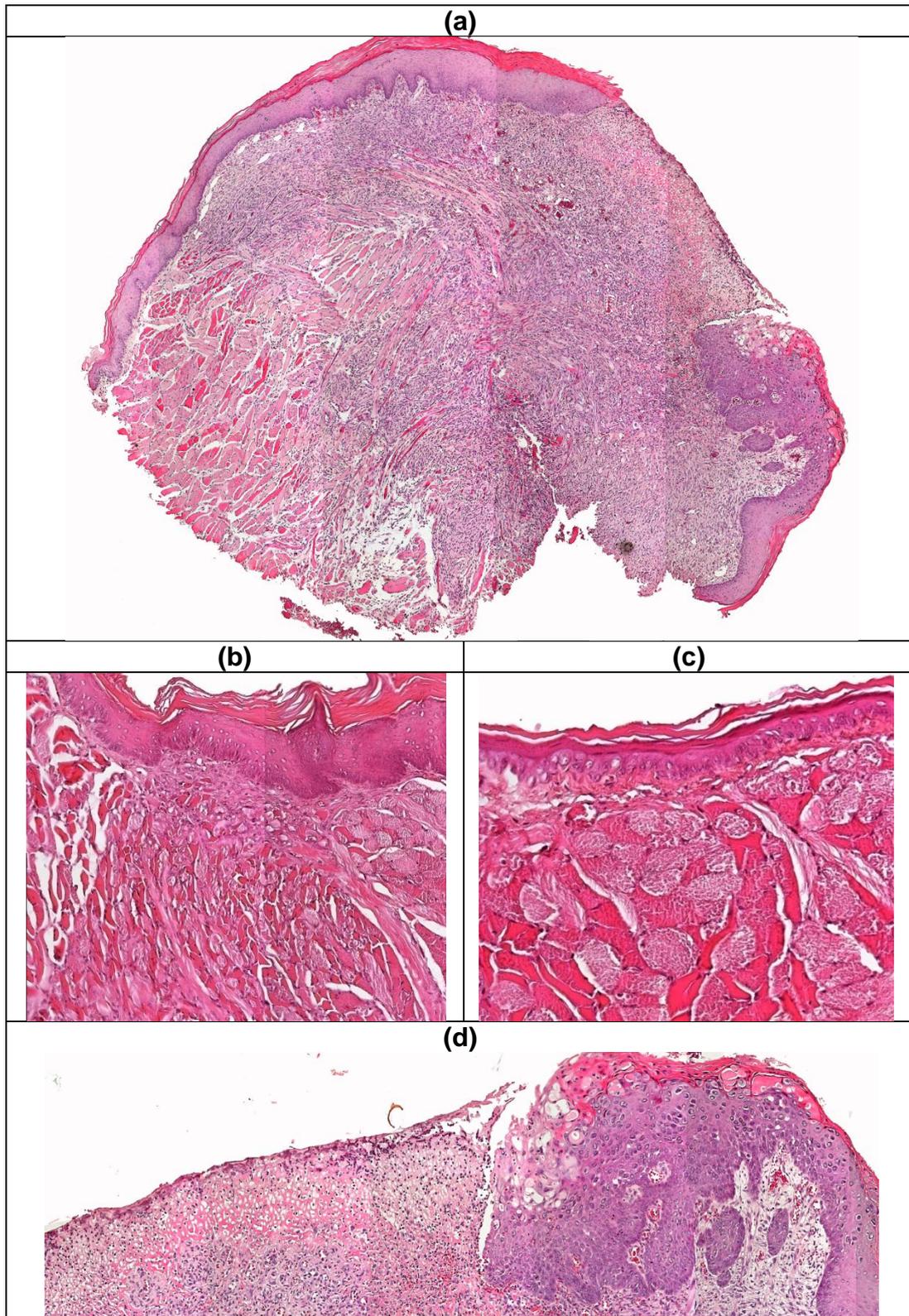
**FIGURA 16 – Grupo BE. 14 dias pós-operatório.** Fotomicrografias exibindo imagem de corte transversal da língua tratada com bisturi elétrico **(a)**; área de abscedação (seta)**(b)**; intensa desorganização tecidual **(c)**; fibras musculares permeadas por tecido conjuntivo **(d)** e em processo de degeneração (setas) **(e)**. [H.E., aumento original: 50x, 100x e 200x]. Fonte: UNESP/ FOSJC (2008).

**Grupo CO<sub>2</sub>:** No fragmento de língua notou-se extensa área ulcerada recoberta por material amorfo de aspecto hialino, associado a colônias bacterianas, em algumas regiões. Reepitelização na área ulcerada mostrou-se bem evidenciada. Em um dos fragmentos, foi observada severa atipia epitelial, apresentando pleomorfismo celular, perda de relação núcleo e citoplasma, hipercromatismo celular, queratinização intra-epitelial, camada basal duplicada e perda da estratificação epitelial. Verificou-se extensa área de tecido conjuntivo bem celularizado, vascularizado e organizado, com um difuso infiltrado de células inflamatórias mononucleares. Este tecido estendeu-se da superfície para a porção mediana do fragmento e, concomitantemente, substituiu o tecido muscular nos planos profundos. Além disso, notou-se a presença de fibras musculares neoformadas, distribuídas aleatoriamente e feixes musculares remanescentes em processo de degeneração localizados nas adjacências da região onde se realizou a exérese (figs. 17 e 18).

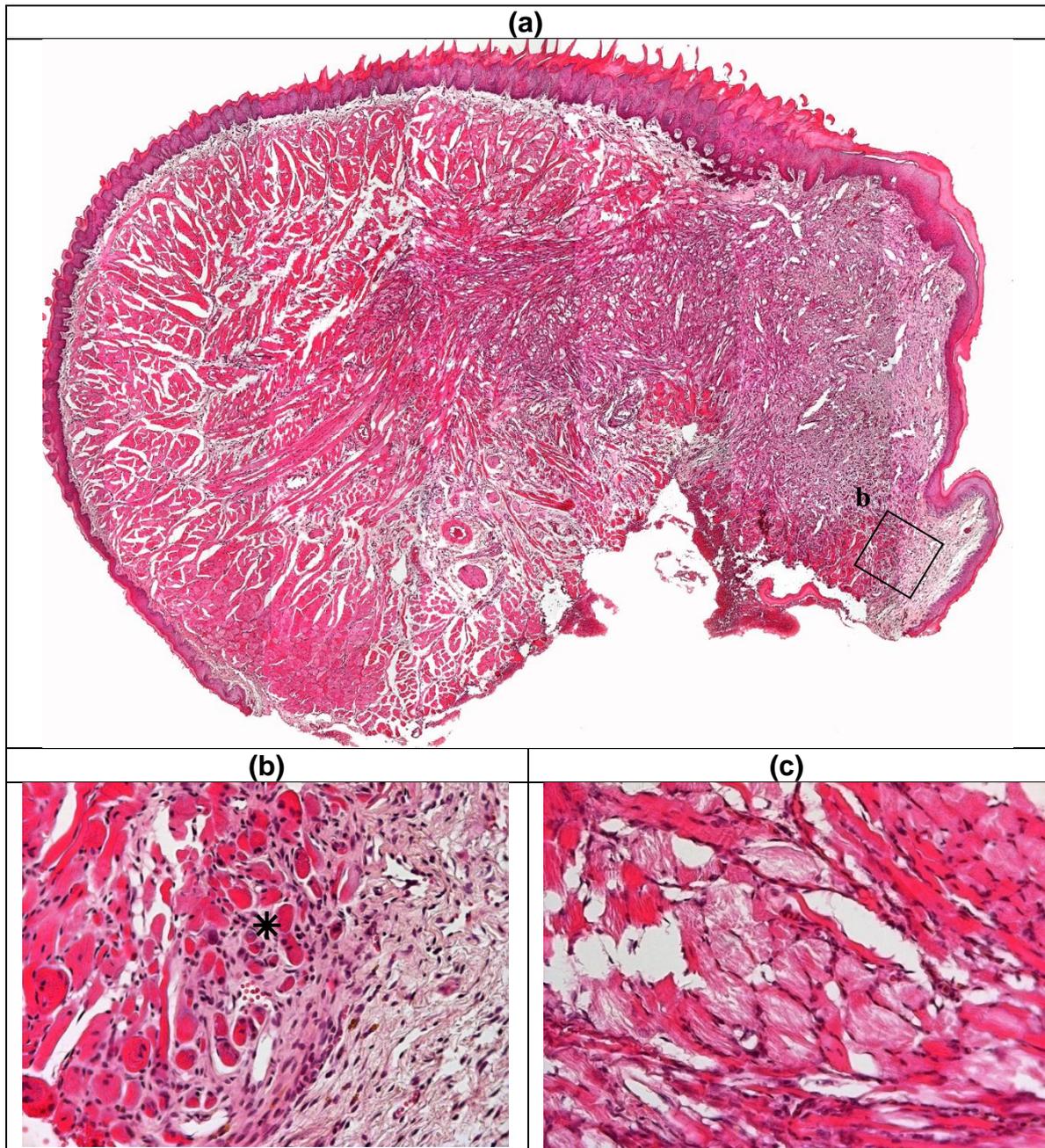
**Grupo Nd:YAG:** A estrutura morfológica do material em análise neste período mostrou-se alterada. Foi observada a substituição dos planos musculares superficial e profundo, até a região mediana do fragmento, por tecido conjuntivo. Este tecido apresentou-se organizado, ricamente celular, com numerosos capilares sangüíneos de lúmen amplo. Observou-se, também, difuso infiltrado de células inflamatórias mononucleares, bem como a presença de fibras musculares neoformadas, distribuídas aleatoriamente, povoando este tecido. Nas adjacências da região lesada, encontraram-se alguns remanescentes de fibras musculares em processo de degeneração. O epitélio neoformado da superfície superior, localizado na região de processo de reparo, apresentou-se pavimentoso estratificado ortoqueratinizado, com ausência de papilas linguais (fig. 19).



**FIGURA 17 – Grupo CO<sub>2</sub>. 14 dias pós-operatório.** Fotomicrografias exibindo imagem de corte transversal de fragmento de língua tratada com radiação laser de CO<sub>2</sub> **(a)**; fibras musculares (setas) permeadas por tecido conjuntivo bem celularizado **(b)** e vascularizado, subjacente à camada hialina (seta) **(c)**. [H.E., aumento original: 50x, 200x e 100x]. Fonte: UNESP/ FOSJC (2008).



**FIGURA 18 – Grupo CO<sub>2</sub>. 14 dias pós-operatório.** Fotomicrografias exibindo imagem de corte transversal de fragmento de língua tratada com radiação laser de CO<sub>2</sub> **(a)**; fibras musculares neoformadas atroficas, distribuídas irregularmente **(b)**, fibras musculares remanescentes em processo de degeneração **(c)**; superfície ulcerada recoberta por material amorfo de aspecto hialino, associada a colônias bacterianas e células inflamatórias; epitélio exibindo atipia celular **(d)**. [H.E., aumento original: 50x, 200x e 200x]. Fonte: UNESP/ FOSJC (2008).

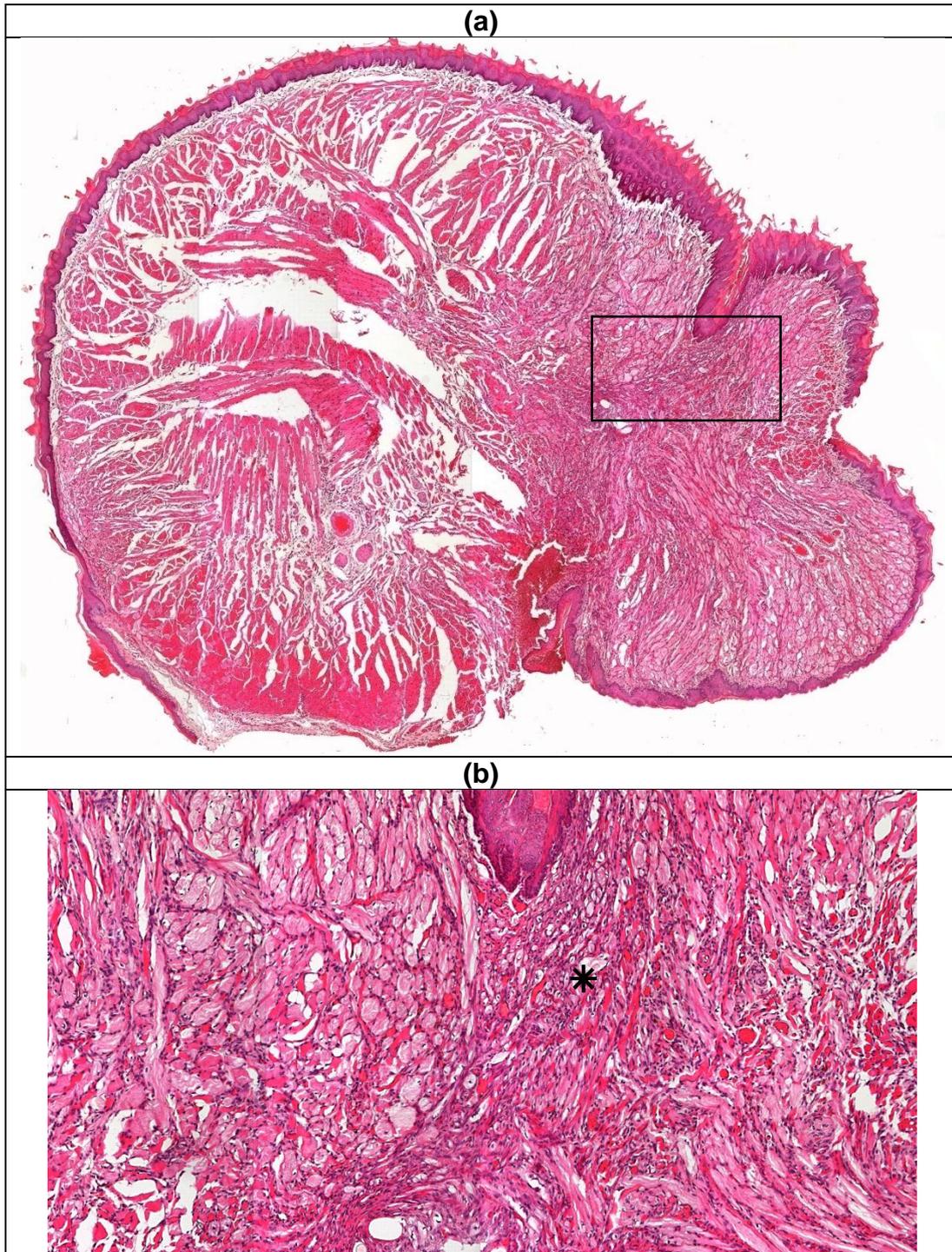


**FIGURA 19 - Grupo Nd:YAG. 14 dias pós-operatório.** Fotomicrografias exibindo imagem transversal de fragmento de língua tratada com radiação laser de Nd:YAG **(a)**; fibras musculares neoformadas (\*) em permeio de tecido conjuntivo ricamente celular **(b)**; fibras musculares em processo de degeneração, localizadas nas adjacências da região de exérese **(c)**. [H.E., aumento original: 50x, 200x e 400x]. Fonte: UNESP/ FOSJC (2008).

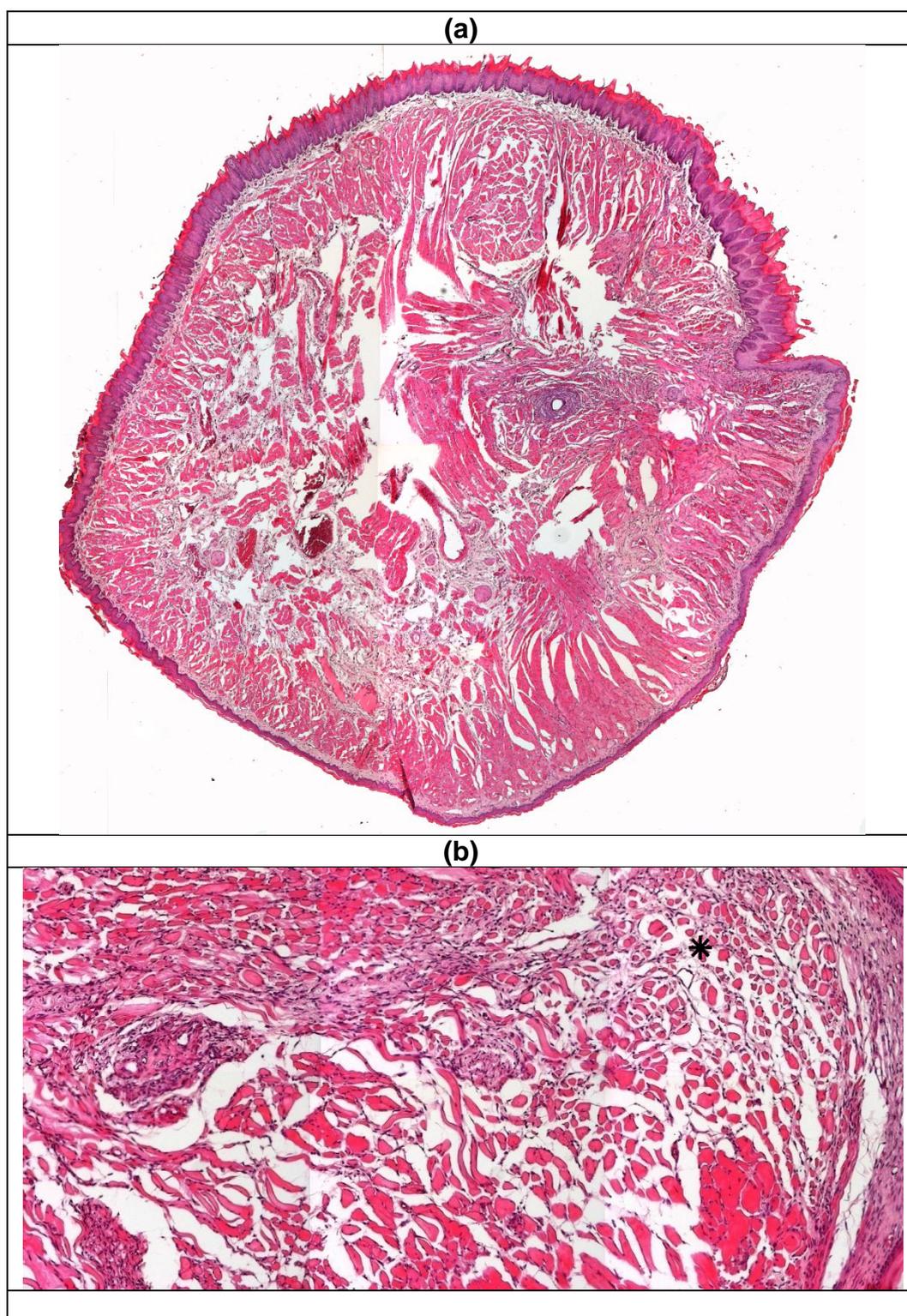
### 5.2.5 Pós-operatório de 21 Dias

**Grupo BC:** O fragmento apresentou, neste período, arquitetura morfológica e estrutural da língua modificada, se relacionada aos aspectos normais. Desta maneira, observou-se aumento de fibras musculares esqueléticas neoformadas na região da exérese. Estas fibras encontraram-se permeadas por tecido conjuntivo frouxo, ora distribuídas irregularmente, ora dispostas em feixes. Apesar deste tecido conjuntivo ser, predominantemente, celular, constatou-se expressiva presença de fibras colágenas com arranjo irregular. Além disso, notou-se moderado infiltrado de células inflamatórias mononucleares. Na região tratada, a superfície mostrou-se totalmente recoberta por epitélio pavimentoso estratificado ortoqueratinizado, com formação de papilas linguais na superfície superior e presença de acantose em algumas áreas. A desorganização tecidual (tecido conjuntivo e fibras musculares neoformadas) mostrou-se mais acentuada na porção mediana do que na região de superfície desta estrutura (fig. 20).

**Grupo BE:** Neste período, observou-se perda significativa da arquitetura morfológica da língua. Na região tratada, notou-se a presença de alguns feixes musculares atróficos e numerosas fibras musculares esqueléticas neoformadas, distribuídas aleatoriamente, ambos permeados por tecido conjuntivo frouxo. O arranjo do conjunto mostrou intensa desorganização tecidual. O tecido conjuntivo apresentou pouca celularidade e vascularização, bem como discreto e difuso infiltrado de células inflamatórias mononucleares. A reepitelização foi completa na região tratada, entretanto se observou ausência de papilas linguais na superfície superior (fig. 21).



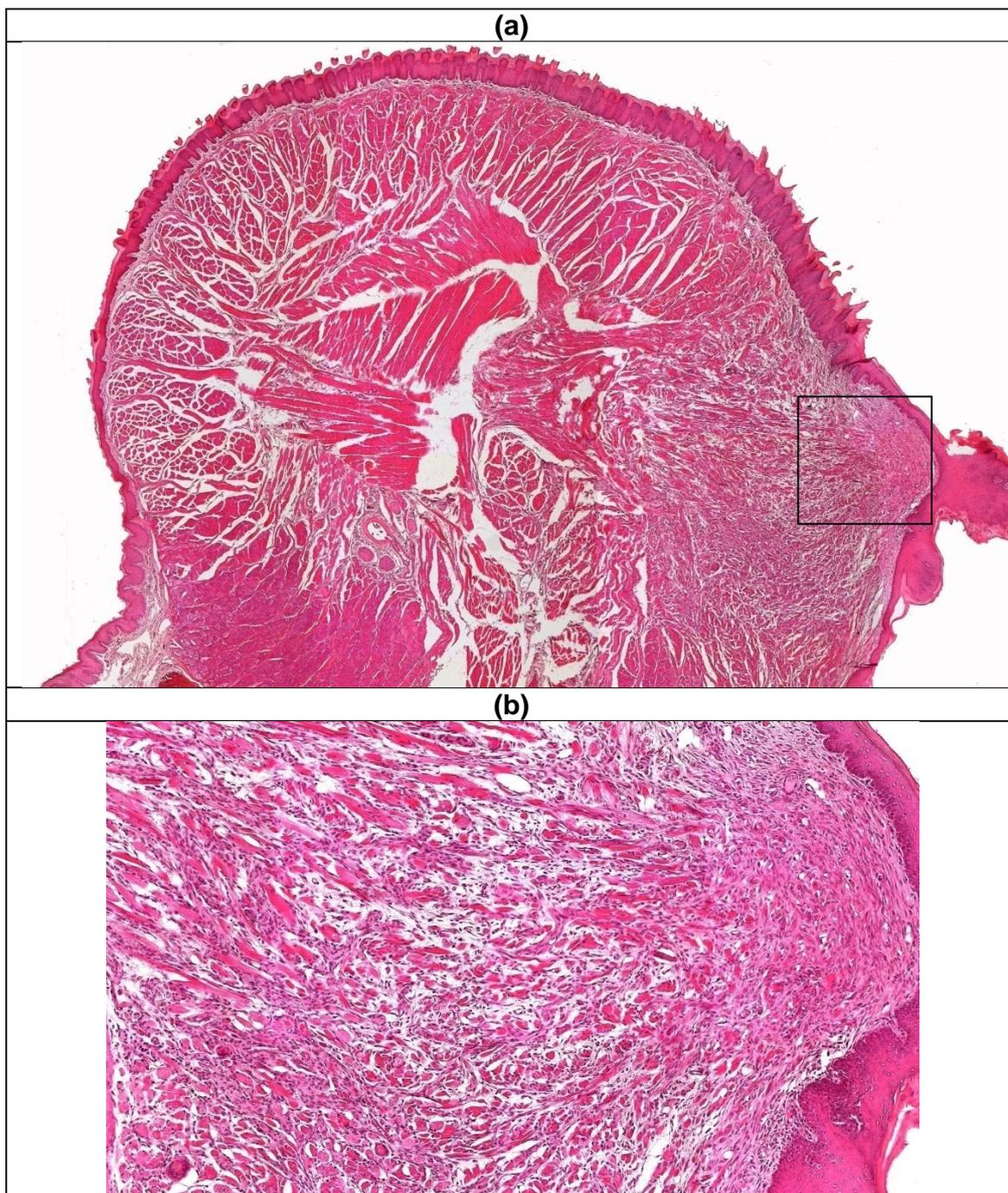
**FIGURA 20 - Grupo BC. 21 dias pós-operatório.** Fotomicrografias exibindo alteração da arquitetura morfológica e estrutural da língua **(a)**; desorganização tecidual (\*) **(b)**. [H.E., aumento original: 50x e 200x]. Fonte: UNESP/ FOSJC (2008).



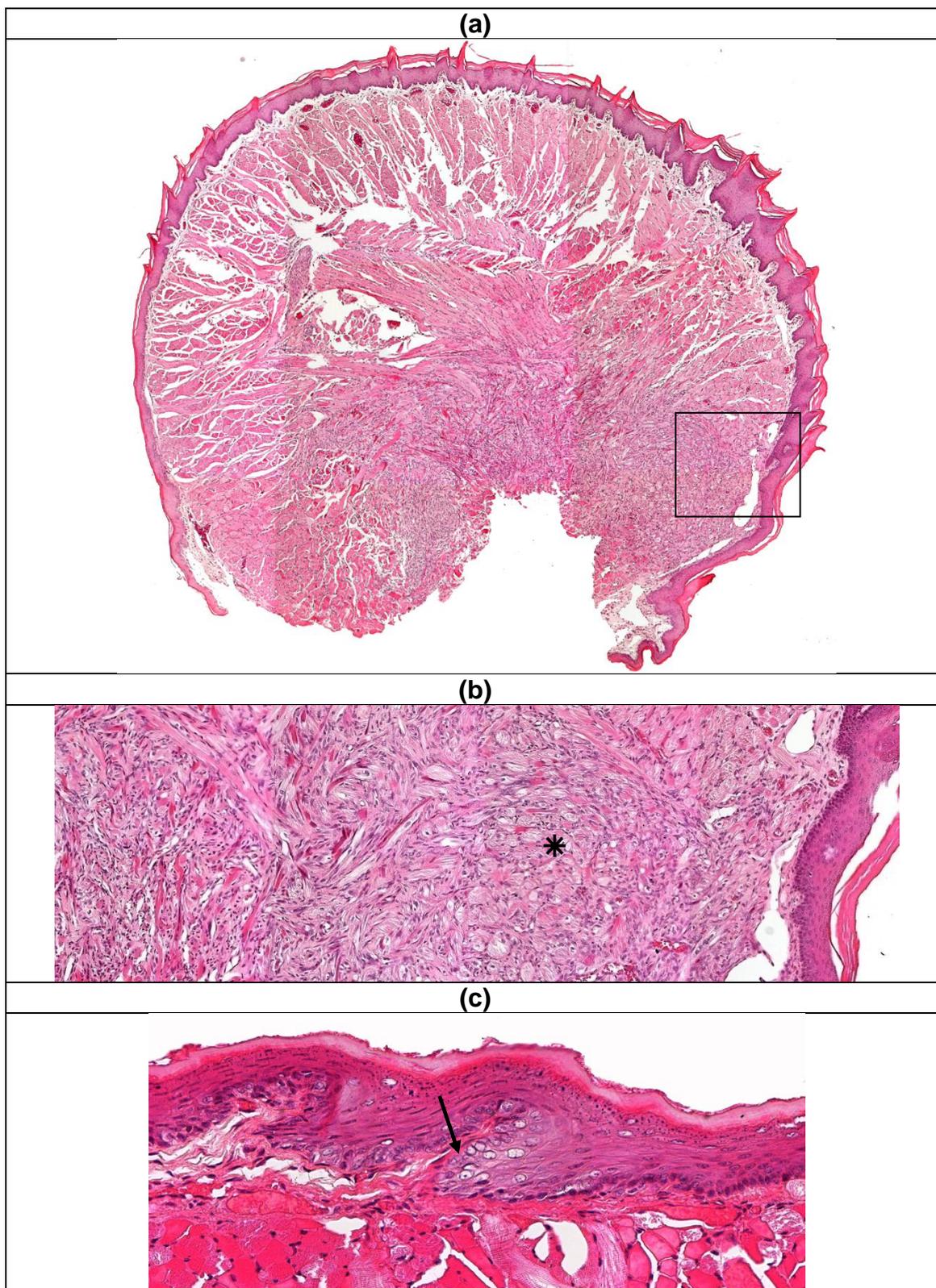
**FIGURA 21 – Grupo BE. 21 dias pós-operatório.** Fotomicrografias exibindo alteração da arquitetura morfológica da língua **(a)**; atrofia de feixes musculares (\*), permeados por tecido conjuntivo frouxo e localizados subjacente ao epitélio da superfície superior **(b)**. [H.E., aumento original: 50x e 100x]. Fonte: UNESP/FOSJC (2008).

**Grupo CO<sub>2</sub>:** A região tratada mostrou numerosas fibras musculares esqueléticas neoformadas, permeadas por tecido conjuntivo bem celularizado, que estavam ora dispostas em feixes, ora distribuídas paralelamente entre si. Estas fibras eram atróficas e de aspecto uniforme, repovoando o tecido conjuntivo e direcionando-se da porção mediana para a superfície. Observou-se reepitelização total desta área, com ausência de papilas linguais (papilas filiformes) na superfície dorsal. Em relação ao tecido muscular, o tecido conjuntivo mostrou-se predominante e estava organizado na porção mediana e desorganizado na região de superfície do fragmento. Constatou-se, ainda, a presença de células inflamatórias mononucleares na região tratada (fig. 22).

**Grupo Nd:YAG:** A região tratada mostrou predominância de fibras musculares neoformadas, dispostas tanto de forma organizada, quanto desorganizada. Além disso, notou-se a presença de algumas fibras musculares neoformadas isoladas, permeadas por tecido conjuntivo bem celularizado. Observou-se, também, que a disposição dos feixes musculares neoformados encontrava-se em fase de organização, caracterizando a dinâmica do processo de reparação, bem como foram encontradas poucas evidências de alterações estruturais destas fibras. Houve completa reepitelização com raras alterações epiteliais, dentre estas, verificaram-se áreas de atipia exibindo perda de estratificação celular, pleomorfismo celular e duplicação da camada basal (fig. 23).



**FIGURA 22 - Grupo CO<sub>2</sub>. 21 dias pós-operatório.** Fotomicrografias exibindo alteração da arquitetura morfológica da língua após a exérese da lesão com radiação de laser CO<sub>2</sub> **(a)**; fibras musculares atróficas, permeadas por tecido conjuntivo frouxo, direcionando-se da porção mediana para a superfície desta estrutura **(b)**. [H.E., aumento original: 50x e 100x]. Fonte: UNESP/ FOSJC (2008).

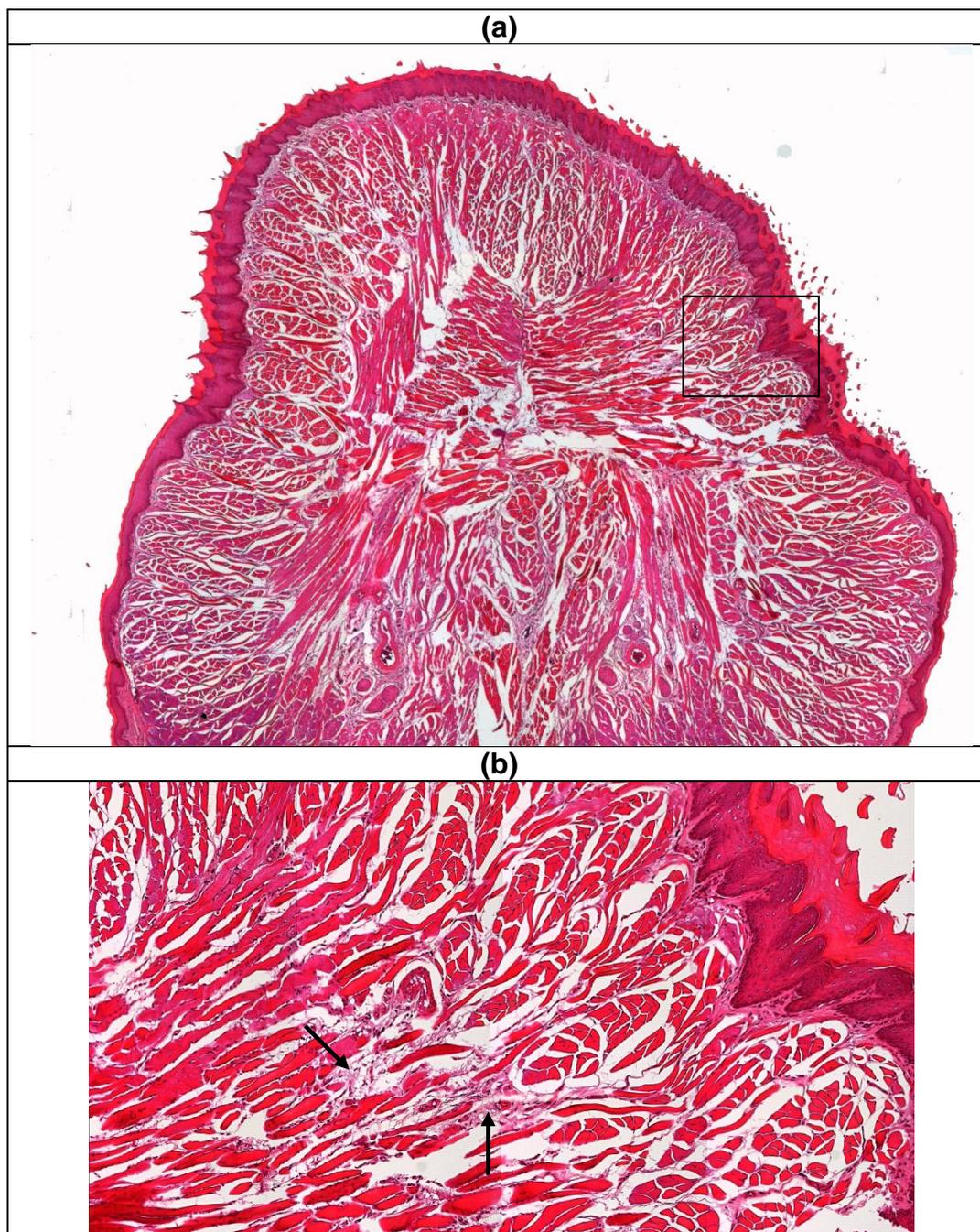


**FIGURA 23 - Grupo Nd:YAG. 21 dias pós-operatório.** Fotomicrografias exibindo alteração da arquitetura morfológica da língua, após a exérese da lesão com radiação de laser Nd:YAG **(a)**; fibras musculares neoformadas em organização **(\*)** **(b)**; atipia epitelial (*seta*) exibindo perda de estratificação celular e relação núcleo e citoplasma, bem como pleomorfismo celular em um dos fragmentos de língua **(c)**. [H.E., aumento original: 50x, 100x e 200x]. Fonte: UNESP/ FOSJC (2008).

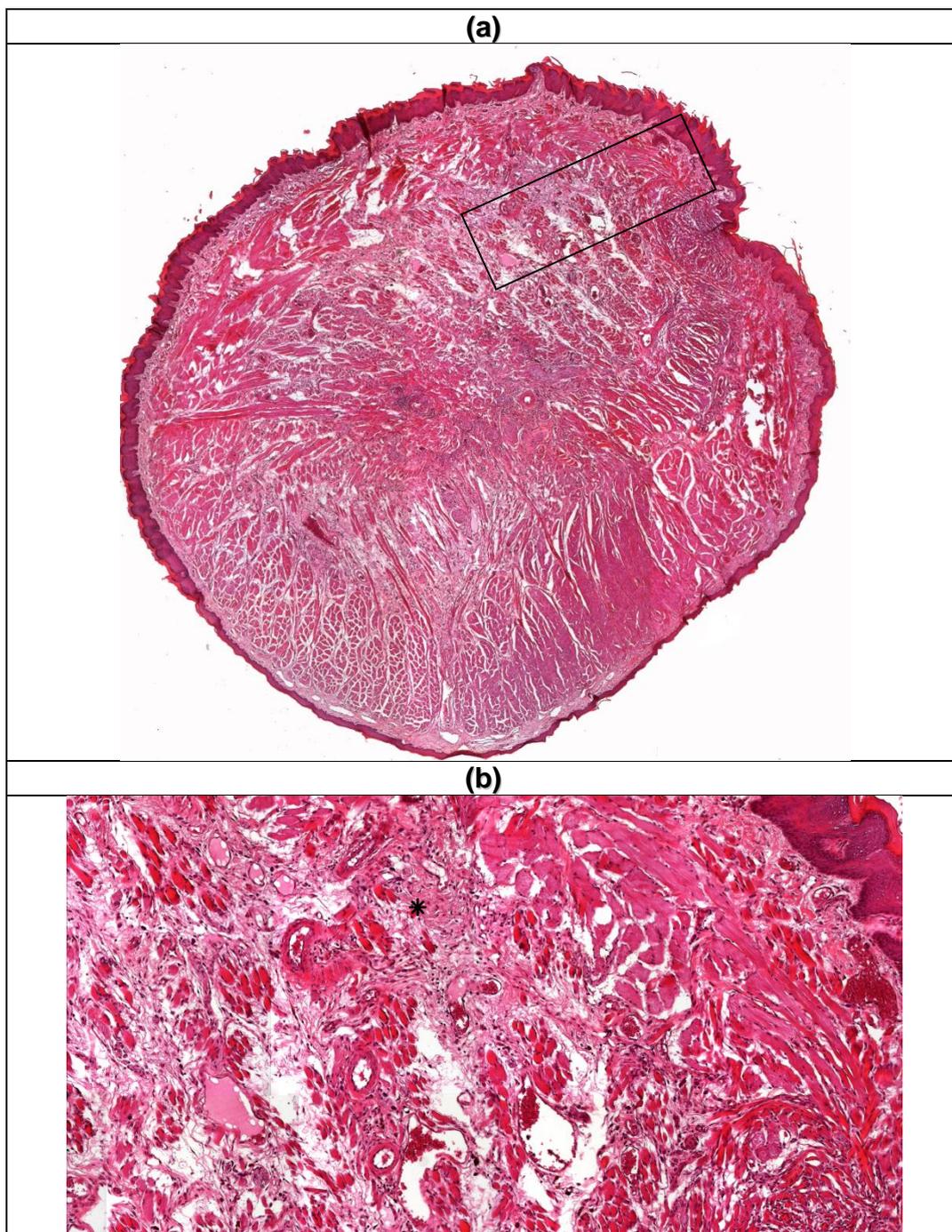
### 5.2.6 Pós-operatório de 28 Dias

**Grupo BC:** Neste período, a arquitetura morfológica da língua mostrou-se modificada, entretanto houve a preservação da arquitetura estrutural deste órgão. Os feixes musculares apresentaram-se numerosos e mais organizados. Foi observado, escasso tecido conjuntivo fibroso permeando os feixes musculares neoformados e evidenciadas raras células inflamatórias mononucleares (fig. 24).

**Grupo BE:** Observou-se perda significativa da estrutura da língua. Na região tratada, notaram-se alguns feixes musculares atróficos e algumas fibras musculares esqueléticas neoformadas, dispostas em grupos isolados e permeadas por tecido conjuntivo, rico em fibras colágenas. O aspecto desorganizado dos componentes teciduais permaneceu neste período. Houve, ainda, predominância de tecido conjuntivo em relação às fibras musculares neoformadas, bem como presença de discreto infiltrado de células inflamatórias mononucleares, assim como o restabelecimento das papilas linguais na superfície superior (fig. 25).



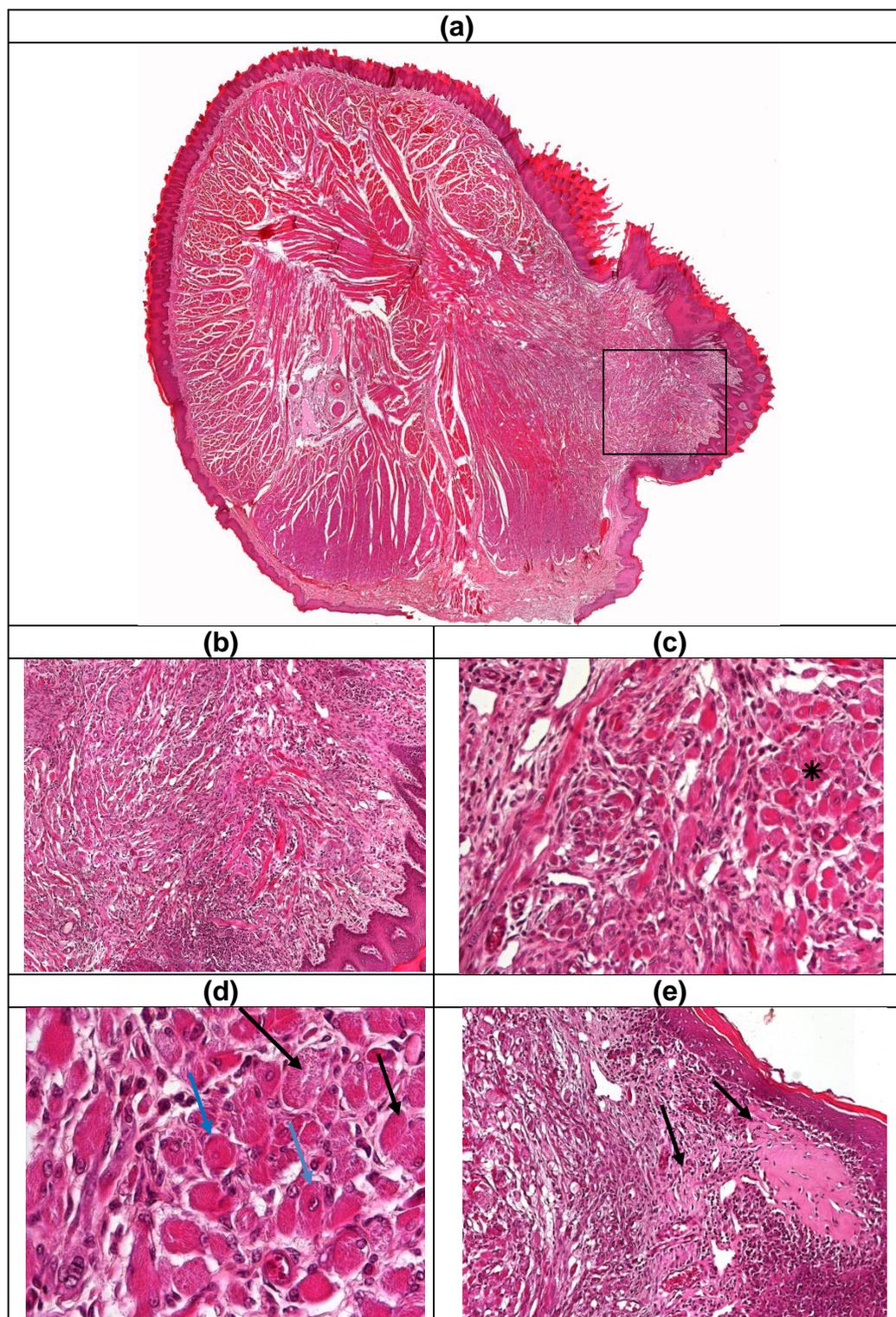
**FIGURA 24 – Grupo BC. 28 dias pós-operatório.** Fotomicrografias exibindo alteração da arquitetura morfológica da língua (a); feixes musculares organizados e presença de tecido conjuntivo fibroso (setas) (b). [H.E., aumento original: 50x e 200x]. Fonte: UNESP/ FOSJC (2008).



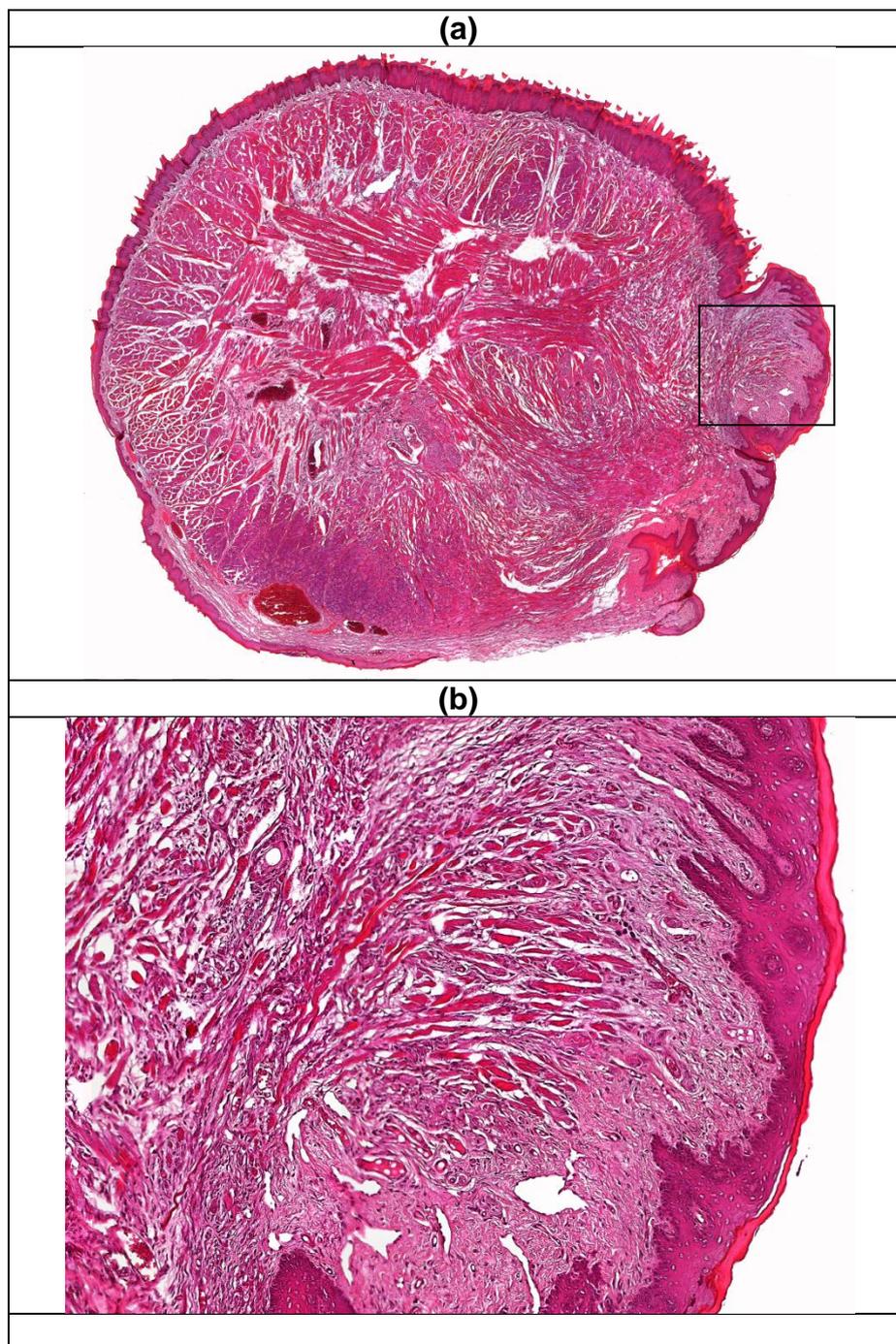
**FIGURA 25 - Grupo BE. 28 dias pós-operatório.** Fotomicrografias exibindo alteração da arquitetura morfológica da língua **(a)**; feixes musculares atróficos, permeados por tecido conjuntivo fibroso (\*) **(b)**. [H.E., aumento original: 50x e 200x]. Fonte: UNESP/ FOSJC (2008).

**Grupo CO<sub>2</sub>:** Tanto a arquitetura estrutural, quanto a morfológica da língua apresentaram-se modificadas. Na região tratada, observou-se predominância de tecido conjuntivo bem celularizado, entremeando fibras musculares esqueléticas neoformadas, que se apresentaram isoladas e, esporadicamente, dispostas em feixes, na maioria dos fragmentos de língua analisados. Além disso, algumas fibras musculares neoformadas apresentaram expressivas alterações estruturais, tais como: núcleos centrais e hipertrofia das fibras. Notou-se, também, presença de moderado infiltrado de células inflamatórias mononucleares, principalmente, na região de superfície do fragmento. Em alguns cortes histológicos, evidenciaram-se remanescentes de material hialino, em processo de degradação, localizados subjacentes ao epitélio pavimentoso estratificado ortoqueratinizado, com degeneração hidrópica e exocitose, circundados por tecido conjuntivo. Este tecido apresentou infiltrado de células inflamatórias, predominantemente, polimorfonucleares e mostrou-se ricamente vascularizado. Acréscimo de papilas linguais (filiformes) na superfície superior, bem como alongamento das projeções epiteliais e áreas de acantose, completaram o quadro histológico (fig. 26).

**Grupo Nd:YAG:** Verificou-se alteração da arquitetura morfológica do órgão e moderada alteração estrutural. Os cortes histológicos evidenciaram predominância de fibras musculares neoformadas, as quais se mostraram mais organizadas na porção mediana, enquanto que, na superfície, essas fibras distribuíram-se isoladamente, direcionando-se perpendicularmente para a região superficial do fragmento, permeadas por tecido conjuntivo rico em fibras colágenas. Raras células inflamatórias foram constatadas, assim como houve ausência de material hialino nos cortes histológicos analisados. A região tratada apresentou pouca formação de papilas linguais e alongamento das cristas epiteliais em algumas áreas (fig. 27).



**FIGURA 26 – Grupo CO<sub>2</sub>. 28 dias pós-operatório.** Fotomicrografias exibindo alteração da arquitetura anatômica da língua **(a)**; feixes musculares permeados por tecido conjuntivo celularizado **(b)**; fibras musculares esqueléticas, dispostas isoladamente e em feixes (\*) permeadas por tecido conjuntivo **(c)**; fibras musculares neoformadas apresentando núcleos centrais (*setas azuis*) e hipertrofia (*setas pretas*) **(d)**; material hialino (*seta*), em processo de degradação, localizado subjacente ao epitélio pavimentoso estratificado ortoqueratinizado, circundado por tecido conjuntivo celularizado, ricamente vascularizado [H.E., aumento original: 50x, 100x, 200x e 400x]. Fonte: UNESP/ FOSJC (2008).



**FIGURA 27 – Grupo Nd:YAG. 28 dias pós-operatório.** Fotomicrografias exibindo alteração da arquitetura morfológica da língua **(a)**; fibras musculares esqueléticas, distribuídas isoladamente e permeadas por tecido conjuntivo rico em fibras colágenas na região superficial **(b)**. [H.E., aumento original: 50x e 100x]. Fonte: UNESP/FOSJC (2008).

### 5.3 Análise Estatística da Histomorfometria

Os dados obtidos da histomorfometria da densidade das fibras musculares esqueléticas ( $\mu\text{m}^2$ ) realizada na área subjacente à exérese de lesão quimicamente induzida em borda lateral de língua de hamster nos períodos propostos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Comparações Múltiplas de Tukey. Os valores encontrados mostram-se computados nas Tabelas 1, 2 e 3 e representados nos Gráficos 1 e 2. Todos os valores foram expressos por média e erro padrão da média (EPM) e o nível de significância adotado foi  $p < 0,05$ .

Para facilitar a interpretação dos resultados, os grupos experimentais foram representados por letras (BC, BE, CO<sub>2</sub> e Nd:YAG) seguidas dos números 7, 14, 21 e 28 correspondentes aos períodos de observação (sete dias, 14 dias, 21 dias e 28 dias) pós-operatórios.

As Tabelas 1 e 2 apresentam, respectivamente, os valores expressos em média e erro padrão da média, bem como a comparação dos grupos experimentais dos dados histomorfométricos da densidade das fibras musculares esqueléticas quantificada nos diferentes períodos de observação do processo de reparação tecidual. Esses dados encontram-se ilustrados no Gráfico 1.

**Tabela 1** - Análise histomorfométrica da densidade de fibras musculares esqueléticas ( $\mu\text{m}^2$ ) da área subjacente à exérese de lesão quimicamente induzida em borda lateral esquerda de língua de hamster. Valores expressos por média  $\pm$  erro padrão da média. Fonte: Elaborado pelo autor (2008).

TEMPOS	GRUPOS (n=5)			
	BC	BE	CO <sub>2</sub>	Nd:YAG
7 dias	2276 $\pm$ 560	1068 $\pm$ 134	1158 $\pm$ 335	1960 $\pm$ 484
14 dias	6920 $\pm$ 243	3480 $\pm$ 964	2717 $\pm$ 332	3550 $\pm$ 519
21 dias	7322 $\pm$ 553	6817 $\pm$ 332	4949 $\pm$ 747	5660 $\pm$ 367
28 dias	6161 $\pm$ 196	6446 $\pm$ 519	6205 $\pm$ 947	4018 $\pm$ 712

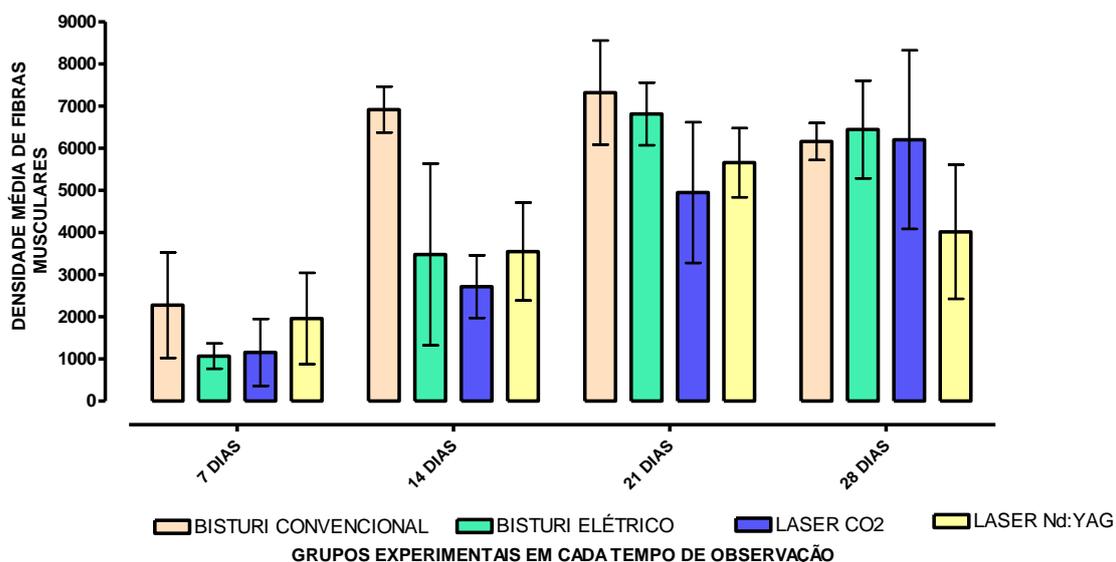
Os maiores valores das médias da densidade de fibras musculares esqueléticas nos diferentes grupos experimentais estudados foram evidenciados no grupo **BC** nos períodos de sete, 14 e 21 dias. No período de 28 dias o grupo **BE** foi o que apresentou o maior valor das médias, no entanto, este mesmo grupo, no período de sete dias mostrou o menor valor. Nos períodos de 14 e 21 dias no grupo **CO<sub>2</sub>** e, aos 28 dias, no grupo **Nd:YAG** é que foram observados os menores valores das médias da densidade de fibras musculares esqueléticas (Tabela 1).

**Tabela 2** - Resultados da Análise de Variância (ANOVA) e Teste de Tukey dos dados histomorfométricos dos grupos BC, BE, CO<sub>2</sub> e Nd:YAG nos diferentes períodos de observação. Comparação entre os grupos. Fonte: Elaborado pelo autor (2008).

<b>TEMPOS</b>	<b>Comparação/Grupos</b>	<b>Valores de p</b>
<b>7 dias</b>	BC / BE	p>0,05
	BC / CO <sub>2</sub>	p>0,05
	BC / Nd:YAG	p>0,05
	BE / CO <sub>2</sub>	p>0,05
	BE / Nd:YAG	p>0,05
	CO <sub>2</sub> / Nd:YAG	p>0,05
<b>14 dias</b>	BC / BE	<b>p&lt;0,01**</b>
	BC / CO <sub>2</sub>	<b>p&lt;0,001***</b>
	BC / Nd:YAG	<b>p&lt;0,01**</b>
	BE / CO <sub>2</sub>	p>0,05
	BE / Nd:YAG	p>0,05
	CO <sub>2</sub> / Nd:YAG	p>0,05
<b>21 dias</b>	BC / BE	p>0,05
	BC / CO <sub>2</sub>	p>0,05
	BC / Nd:YAG	p>0,05
	BE / CO <sub>2</sub>	p>0,05
	BE / Nd:YAG	p>0,05
	CO <sub>2</sub> / Nd:YAG	p>0,05
<b>28 dias</b>	BC / BE	p>0,05
	BC / CO <sub>2</sub>	p>0,05
	BC / Nd:YAG	p>0,05
	BE / CO <sub>2</sub>	p>0,05
	BE / Nd:YAG	p>0,05
	CO <sub>2</sub> / Nd:YAG	p>0,05

\*Diferença estatisticamente significativa (p < 0,05)

Na Tabela 2 as diferenças estatisticamente significantes na densidade das fibras musculares esqueléticas foram evidenciadas, apenas, no período de 14 dias, entre o grupo **BC** em relação aos grupos **BE**, **CO<sub>2</sub>** e **Nd:YAG**.



**GRÁFICO 1** - Densidade de fibras musculares esqueléticas ( $\mu\text{m}^2$ ) da área subjacente à exérese da lesão quimicamente induzida em língua de hamster nos grupos BC, BE, CO<sub>2</sub> e Nd:YAG nos diferentes períodos de observação. Comparação entre os grupos. Cada coluna representa a média de cinco animais e as barras verticais os erros padrão da média. Fonte: Elaborado pelo autor (2008).

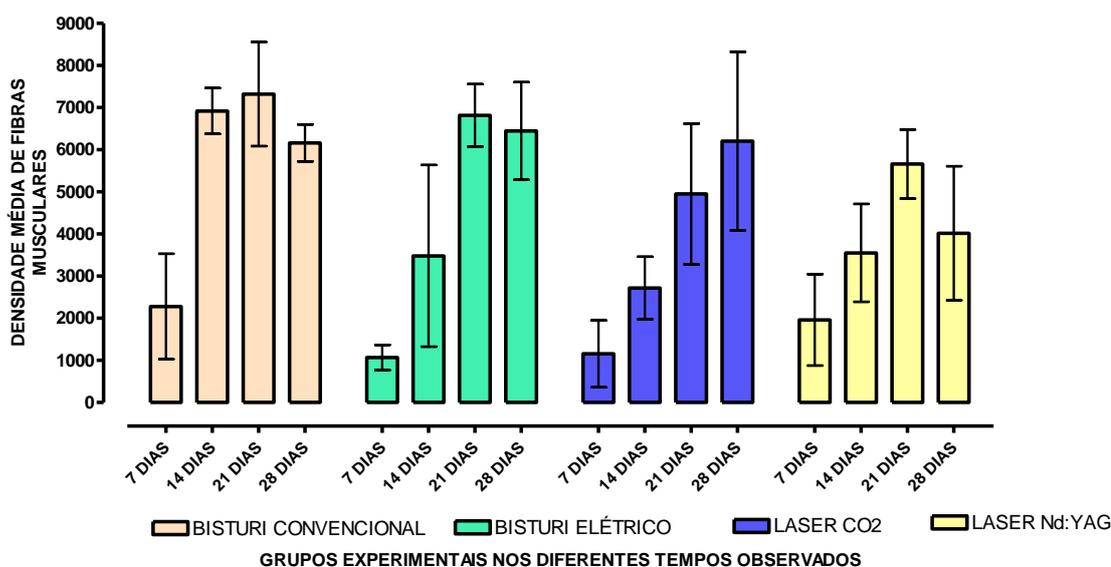
**Tabela 3** - Resultados da Análise de Variância (ANOVA) e Teste de Tukey dos dados histomorfométricos dos grupos BC, BE, CO<sub>2</sub> e Nd:YAG nos diferentes períodos de observação. Comparação entre os Tempos. Fonte: Elaborado pelo autor (2008).

<b>Grupos experimentais</b>	<b>Comparação/Tempos</b>	<b>Valores de p</b>
<b>BC</b>	BC7 / BC14	<b>p&lt;0,001***</b>
	BC7 / BC21	<b>p&lt;0,001***</b>
	BC7 / BC28	<b>p&lt;0,001***</b>
	BC14 / BC 21	p>0,05
	BC14 / BC28	p>0,05
	BC21 / BC28	p>0,05
<b>BE</b>	BE7 / BE14	p>0,05
	BE7 / BE21	<b>p&lt;0,001***</b>
	BE7 / BE28	<b>p&lt;0,001***</b>
	BE14 / BE21	<b>p&lt;0,01**</b>
	BE14 / BE28	p>0,05
	BE21 / BE28	p>0,05
<b>CO<sub>2</sub></b>	CO <sub>2</sub> 7 / CO <sub>2</sub> 14	p>0,05
	CO <sub>2</sub> 7 / CO <sub>2</sub> 21	<b>p&lt;0,01**</b>
	CO <sub>2</sub> 7 / CO <sub>2</sub> 28	<b>p&lt;0,001***</b>
	CO <sub>2</sub> 14 / CO <sub>2</sub> 21	p>0,05
	CO <sub>2</sub> 14 / CO <sub>2</sub> 28	<b>p&lt;0,01**</b>
	CO <sub>2</sub> 21 / CO <sub>2</sub> 28	p>0,05
<b>Nd:YAG</b>	Nd:YAG7 / Nd:YAG14	p>0,05
	Nd:YAG7 / Nd:YAG21	<b>p&lt;0,01**</b>
	Nd:YAG7 / Nd:YAG28	p>0,05
	Nd:YAG14 / Nd:YAG21	p>0,05
	Nd:YAG14 / Nd:YAG28	p>0,05
	Nd:YAG21 / Nd:YAG28	p>0,05

\*Diferença estatisticamente significativa (p < 0,05)

A Tabela 3 mostra os dados obtidos da análise histomorfométrica na comparação individual dos grupos entre os períodos propostos. Os valores expressos em média e erro padrão da média apresentados na Tabela 1 encontram-se ilustrados no Gráfico 2.

O grupo **BC** mostrou diferenças estatísticas significantes entre os períodos de sete e 14, sete e 21 e sete e 28 dias pós-operatórios (Tabela 3). Dentre os quais, os maiores valores das médias da densidade das fibras musculares esqueléticas foi observado no período de 21 dias (Tabela 1 e Gráfico 2). No grupo **BE** as diferenças estatísticas na densidade das fibras musculares esqueléticas foram evidenciadas nos períodos entre sete e 21, sete e 28 e 14 e 21 dias (Tabela 3). Verificou-se que o maior valor das médias encontrado neste grupo foi no período de 21 dias (Tabela 1 e Gráfico 2). No grupo **CO<sub>2</sub>** constatou-se que as diferenças estatísticas ocorreram nos períodos entre sete e 21, sete e 28 e entre 14 e 28 dias (Tabela 3), sendo que o maior valor nas médias foi observado no período de 28 dias (Tabela 1 e Gráfico 2). Já no grupo **Nd:YAG**, houve diferença estatística significativa, apenas, no intervalo entre sete e 21 dias (Tabela 3) e, neste período, foi observado o maior valor nas médias da densidade das fibras musculares esqueléticas (Tabela 1 e Gráfico 2).



**GRÁFICO 2** - Densidade de fibras musculares esqueléticas ( $\mu\text{m}^2$ ) da área subjacente à exérese da lesão quimicamente induzida em língua de hamster nos grupos BC, BE, CO<sub>2</sub> e Nd:YAG nos diferentes períodos de observação. Comparação entre os tempos. Cada coluna representa a média de cinco animais e as barras verticais os erros padrão da média. Fonte: Elaborado pelo autor (2008).

DISCUSSÃO



## 6 DISCUSSÃO

Os resultados clínico e histomorfológico desta pesquisa evidenciaram perda significativa da estrutura da língua em todos os grupos estudados, nos quatro períodos de observação, mostrando um processo não regenerativo deste órgão. Todavia, apesar da perda tecidual, todos os grupos apresentaram, clinicamente, extensa redução no tamanho da ferida.

Na análise clínica deste estudo foi observado menor edema e ausência de sangramento nas áreas tratadas com radiação laser de CO<sub>2</sub> e de Nd:YAG no pós-operatório imediato. Ao contrário do que foi verificado nos animais do grupo BC, nos quais constatou-se presença de edema e sangramento, no referido período. O mesmo foi constatado por Luomanen, Lehto, Meurman (1988) ao analisarem a reparação de incisões realizadas com bisturi convencional e radiação laser de CO<sub>2</sub> em mucosa bucal de ratos. Esta característica clínica de diminuição de edema, observada no grupo CO<sub>2</sub>, permite sugerir que com a vantagem deste tipo de radiação do selamento imediato dos vasos sangüíneos, foi possível evitar o extravasamento de fluido e células do sangue ao espaço extracelular. Outros autores também observaram episódios de hemorragia quando compararam feridas provocadas com bisturi convencional, nas quais foram realizadas suturas, em relação àquelas feitas com bisturi elétrico e com radiação laser de CO<sub>2</sub> (WALSH, 1996; PAES-JÚNIOR; NICCOLI-FILHO, 2001; SINHA; GALLAGHER, 2004; CAMACHO-ALONSO; LÓPEZ-JORNET, 2007). No período de 14 dias, o discreto sangramento observado na região do reparo em língua no grupo BC em alguns animais pode estar, possivelmente associado a trauma de mordida e/ou alimentação.

O bisturi convencional é o instrumento mais comumente utilizado em incisões cirúrgicas, apesar de apresentar desvantagens, tais como dificuldade de visualização do campo operatório e perda sangüínea, resultantes de hemorragia (CAMACHO-ALONSO; LÓPEZ-JORNET, 2007). Entretanto, Arashiro et al. (1996) sugeriram que incisões realizadas utilizando-se bisturi convencional produziram mínimo trauma ao tecido adjacente e repararam mais rapidamente em comparação a outras ferramentas cirúrgicas. A análise clínica no presente estudo evidenciou uma tendência à reparação tecidual mais rápida das feridas no grupo BC. Entretanto,

histologicamente, esse aspecto relativo ao menor tempo na reparação deste grupo, em comparação aos demais, foi observado apenas no período inicial. Enfatiza-se que a utilização da radiação laser de CO<sub>2</sub> como ferramenta para diérese de tecidos necróticos, causa um processo de carbonização das bordas cirúrgicas, o qual retarda o processo de reparação sem interferir, contudo, na reparação a longo prazo e na qualidade estética (PICK; COLVARD, 1993; CATONE; ALLING, 1997; FRIESEN et al., 1999; PAES-JÚNIOR; NICCOLI-FILHO, 2001).

Na maioria dos animais do grupo Nd:YAG, aos 14 dias, foi observada pequena depressão central na área vaporizada; isto pode ser justificado pela maior penetração deste tipo de radiação laser no tecido, pela perda significativa da estrutura e, ainda, pela resposta individual de cada espécime.

O uso da radiação laser como ferramenta cirúrgica alternativa ao bisturi convencional, traz grande vantagem, pois promove o selamento de vasos sanguíneos de até 0,5 mm e de 1 a 2 mm de diâmetro, utilizando-se os lasers de CO<sub>2</sub> e de Nd:YAG, respectivamente, no exato momento em que se realiza a diérese dos tecidos, proporcionando campo operatório limpo (FRAME, 1985; McKENZIE, 1990; PICK, COLVARD, 1993). Outra vantagem da utilização da radiação laser em procedimentos cirúrgicos deve-se ao fato desta, ao contrário do eletrocautério, não desencadear contrações musculares, pois constitui um feixe luminoso e não um estímulo elétrico. Além disso, permite uma boa delimitação das margens para ressecção de lesões, possibilitando uma incisão linear nos tecidos, sendo que estes tecidos permanecem estáticos durante todo o procedimento (PAES-JÚNIOR; NICCOLI-FILHO, 2001). Foi possível notar clinicamente, que no período imediato ao ato cirúrgico, a área de tecido carbonizado abrangia estritamente a área incisada. Esse aspecto de limitação do dano concorda com os achados de Robinson et al. (1987), os quais avaliaram a união de tecidos moles por vaporização com radiação laser de CO<sub>2</sub>.

Especificamente para o laser de CO<sub>2</sub>, a absorção é diretamente proporcional à quantidade de água dos tecidos. Tecidos muscular, cartilaginoso e ósseo, que contêm menor quantidade de água, sofrem grande dano térmico, tornando o controle da potência do laser um fator fundamental para a extensão do dano (CLAYMAN; KUO, 1997). Neste estudo, os dois tipos de radiação laser foram utilizados em modo

contínuo, sendo possível controlar-se a extensão do dano térmico, seguindo os parâmetros propostos por Niccoli-Filho, Sampaio e Guimarães-Filho (2001), o que possibilitou melhor controle da área de atuação, limitação do dano e mínima propagação da energia térmica aos tecidos adjacentes.

Patrocínio e Niccoli-Filho (2001) citaram que, se por um lado a utilização de uma maior potência contribui para menor tempo operatório, por outro lado, causa maior dano tecidual. A utilização de potências adequadas, como as utilizadas nesta pesquisa, corroboraram com o estudo realizado por Wilder-Smith et al. (1995), no qual foi descrito que um melhor desempenho das propriedades da radiação laser está relacionado à densidade de potência, ou seja, energia suficiente para aquecer o tecido, que conduz à temperatura de vaporização, pois o tecido é vaporizado antes que qualquer acúmulo de calor seja propagado às áreas adjacentes.

Durante a evolução do processo de reparação tecidual da lesão ulcerada, induzida pelo oleato de monoetanolamina (Ethamolin®) em língua de hamster e tratada por bisturi convencional, bisturi elétrico, radiação laser de CO<sub>2</sub> e de Nd:YAG observou-se que o mecanismo fisiopatológico poderia ser classificado em três etapas: necrótica (sete dias), substituição (14 dias) e reparadora (21 e 28 dias). A fase necrótica se mostrou constituída por extensas áreas de tecido necrótico na superfície da lesão tratada, associada a colônias bacterianas, além de edema. Na camada subjacente, havia intenso infiltrado de células inflamatórias, predominantemente polimorfonucleares, com presença de tecido de granulação e fibras musculares esqueléticas danificadas, as quais se encontravam permeadas neste tecido. Observou-se também, material amorfo de aspecto hialino recobrimdo a superfície da lesão nos animais dos grupos tratados com instrumentos térmicos, promovendo um efeito de curativo biológico. A fase de substituição caracterizou-se pela modificação do tecido de granulação por tecido conjuntivo neoformado com aspecto desorganizado, rico em fibroblastos e intensamente vascularizado, com predominância de intenso infiltrado de células inflamatórias mononucleares. Foi, ainda, observado início de formação de fibras musculares esqueléticas, sendo que estas se encontravam permeadas por tecido conjuntivo neoformado. O material hialino presente em alguns espécimes dos grupos BE e radiação laser, encontrava-se em processo de degradação e foi observada presença de células gigantes

multinucleadas, particularmente, no grupo CO<sub>2</sub>. A reepitelização foi bem evidenciada nesta fase. A fase reparadora caracterizou-se pelo ativo repovoamento e organização das fibras musculares esqueléticas neoformadas no tecido conjuntivo, ora frouxo ora fibroso, na tênue vascularização e no discreto infiltrado de células inflamatórias mononucleares. Nesta etapa, a superfície da lesão mostrou-se totalmente reepitelizada e com preservação de feixes de fibras nervosas nas áreas mais profundas.

Nesta pesquisa, verificou-se que o oleato monoetanolalmina (Ethamolin®), substância indutora da lesão, se disseminou pelas camadas musculares da língua, o que provocou extensas áreas de necrose. Este fato ocorreu devido à associação entre a alta toxicidade desta droga, com a ação mecânica durante a administração da mesma. Segundo Masaki et al. (1990) e Cruz-Filho et al. (2002), o oleato monoetanolalmina, considerada substância esclerosante, pode solubilizar as membranas celulares e as adesões intercelulares, aumentando a permeabilidade da membrana endotelial, condicionando sua lesão e posterior necrose celular e tecidual, esta última, foi evidenciada na análise histomorfológica neste estudo.

No período de sete dias, a extensão da área de necrose no grupo BC foi significativamente menor do que nos demais grupos. A análise histomorfológica mostrou menor dano tecidual, uma vez que não foi submetido aos efeitos de termocoagulação e carbonização da radiação laser e de queimadura do bisturi elétrico (ROMANOS et al., 1999; CAMACHO-ALONSO; LÓPEZ-JORNET, 2007). Alguns autores descreveram, ainda, que as feridas provocadas por bisturi convencional não causam quaisquer danos térmicos, mas permitem extravasamento de sangue e linfa, causando uma resposta inflamatória mais acentuada e resultando em maior edema e formação de cicatrizes (FISHER et al., 1983; POGREL, 1989; WILDER-SMITH et al., 1995). Assim também, diante dos danos teciduais provocados pela radiação laser e do bisturi elétrico, outros autores constataram retardo no tempo do processo de reparo (SMALL et al., 1979; LUOMANEN, 1987; LUOMANEN; LEHTO; MEURMAN, 1988; WALSH, 1996; CATONE; ALLING, 1997; FRIESEN et al., 1999; ROMANOS; SIAR; TOH, 1999; PAES-JÚNIOR; NICCOLI-FILHO, 2001). Isto também foi confirmado pelos resultados da análise histomorfológica nesta pesquisa.

Para Small et al. (1979), Catone e Alling (1997) e Friesen et al. (1999) o retardo no processo de reparação em feridas provocadas pela radiação laser de CO<sub>2</sub>, quando comparadas às incisões com bisturi convencional, ocorre devido à presença do tecido carbonizado, ao lento processo de reabsorção deste, à diminuição da atividade fibroblástica, à formação do tecido de granulação e ao retardo no início da reepitelização. No presente estudo, o tecido carbonizado foi evidenciado nos períodos de sete e 14 dias, o que corrobora na justificativa do retardo da reparação tecidual observado nos resultados histomorfológicos.

Nos períodos de sete e 14 dias, nos grupos tratados com radiação laser, foram observadas extensas áreas cruentas revestidas por espessa camada de material amorfo de aspecto hialino. De acordo com os estudos de Thuaksuban e Nuntanaranont (2003), Sinha e Gallagher (2003), Horch e Deppe (2005) a presença deste material hialino é resultante da denaturação das proteínas e favorece a contração dos tecidos. Outros autores descreveram ainda, que esta camada hialina, de colágeno denaturado, observada na superfície irradiada no início da reparação, age como um curativo biológico impermeável, reduzindo o grau de irritação dos tecidos envolvidos e, conseqüentemente, da intensidade do processo inflamatório, atuando como barreira biomecânica para microorganismos e hemorragias (FISHER et al., 1983; EVRARD; NAMMOUR; DOUROV; 1995; ROMANOS et al., 1999; PATROCÍNIO; NICCOLI-FILHO, 2000; THUAKSUBAN; NUNTANARANONT, 2003; MOROSOLLI; SCHUBERT; NICCOLI-FILHO, 2006). Todavia, Yu, Naim e Lanzafame (1994) consideraram que este material hialino corresponde à coagulação e denaturação das proteínas da matriz extracelular com a presença evidente de fatores de crescimento. Assim, esta barreira poderia também agir como material indutor de diversas funções celulares.

A presença de remanescentes de material hialino foi observada no período de 28 dias no grupo CO<sub>2</sub>; a persistência desta estrutura hialina pode justificar o discreto retardo no processo de reparação tecidual, quando comparados os grupos radiação laser. Em relação ao fato da língua ser altamente vascularizada, entre os dois lasers utilizados nesta pesquisa, o laser de Nd:YAG seria o instrumento de eleição, uma vez que promove eficiente coagulação em tecidos vascularizados devido a sua máxima absorção e penetração nestes tecidos, em virtude de seu menor comprimento de onda (BRADLEY, 1997). O mesmo autor descreveu em seus

estudos que os comprimentos de onda da radiação laser CO<sub>2</sub> e Nd:YAG são 10,6 µm e 1,064 µm, respectivamente.

A reepitelização foi observada na maioria dos animais em todos os grupos aos 14 dias pós-operatório, a qual mostrou-se completa no período de 21 dias. Este fenômeno não foi bem evidenciado aos sete dias, devido à extensão da área de necrose tecidual, associada a colônias bacterianas e aos efeitos da toxicidade da droga indutora. Em pesquisas realizadas por Kardos, Holt e Ferguson (1989), Fortune et al., (1998) e Romanos, Siar e Toh (1999) foi observada presença de tecido de granulação e migração de células epiteliais aos sete dias, após incisões com radiação laser de CO<sub>2</sub>. Por outro lado, Sinha e Gallagher (2003) observaram a reepitelização ao final do período de 28 dias. Esta variação de tempo, em relação à reepitelização, ratifica a hipótese de que o grau de dano tecidual pode influenciar na ocorrência deste fenômeno.

De acordo com Fisher et al. (1983), a área irradiada requer um tempo maior para a reepitelização, porque a migração celular está comprometida pela diminuição do número de miofibroblastos causada pelo agente agressor; neste caso, a geração de altas temperaturas. Nas feridas provocadas por bisturi convencional, os miofibroblastos são poucos danificados e estão situados paralelamente à superfície. Desta maneira, quando se contraem no sentido de seu eixo longitudinal, tracionam as fibras colágenas e reduzem o tamanho da ferida. Por outro lado, quando se utiliza a radiação laser de CO<sub>2</sub> e de Nd:YAG, observa-se diminuição na quantidade de miofibroblastos, com distribuição aleatória ou desorganizada, o que conduz a uma menor contração da ferida. Os mesmos autores, ainda, afirmaram que este fenômeno não está totalmente esclarecido em relação aos tecidos irradiados.

Uma alteração tecidual, não encontrada na literatura, foi a severa atipia epitelial, a qual foi evidenciada apenas em um animal do grupo CO<sub>2</sub> no período de 14 dias. Este achado pode ter ocorrido devido a uma reação tecidual tardia do animal em relação aos efeitos da toxicidade da droga, após a aplicação deste tipo de radiação laser.

Nos grupos BE, CO<sub>2</sub> e Nd:YAG, principalmente no período de sete dias, na área de exérese, havia intenso infiltrado de células inflamatórias, com predomínio de polimorfonucleares na região de superfície, assim como foram evidenciadas também

numerosas células gigantes multinucleadas nos animais do grupo CO<sub>2</sub>. É possível que este fato seja relacionado à presença de extensas áreas ulceradas e necróticas e à presença de colônias bacterianas. Estes aspectos histomorfológicos foram também observados por Romanos, Pelekanos e Strub (1995), Liboon, Funkhouser e Terris (1997), Romanos et al. (1999), Patrocínio e Niccoli-Filho (2000) e Sinha e Gallagher (2003). Todavia, Camacho-Alonso e López-Jornet (2007) evidenciaram maior quantidade de células inflamatórias mononucleares no período de sete dias após utilização do bisturi convencional, o que também foi constatado nos resultados da presente pesquisa, no mesmo período.

Durante a evolução do processo de reparo verificou-se que o infiltrado inflamatório foi predominantemente mononuclear, a partir do período de 14 dias nos grupos BC, Nd:YAG e CO<sub>2</sub>. Ainda nestes períodos iniciais, observou-se substituição de tecido muscular original por tecido conjuntivo bem celularizado em todos os grupos estudados, destacando-se a intensa vascularização, principalmente, nos grupos tratados com radiação laser. Portanto, a neovascularização foi bem evidenciada tanto no grupo CO<sub>2</sub> quanto no grupo Nd:YAG, principalmente nos dois primeiros períodos de observação. Esses achados sugerem a possibilidade da radiação laser de alta potência apresentar propriedade angiogênica. Diante desta observação, torna-se oportuno que outros estudos complementares sejam realizados com o auxílio da técnica de imunistoquímica utilizando o anticorpo VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), responsável pela proliferação de células endoteliais e formação de vasos sanguíneos.

No período de 28 dias foi verificado que havia, ainda, presença significativa do tecido conjuntivo fibroso nos grupos BE, CO<sub>2</sub> e Nd:YAG, quando comparados com o grupo BC. As características histomorfológicas deste tipo de tecido determinam uma diminuição na contração da ferida e, conseqüentemente, limitação da função deste órgão, o que também foi observado por diversos autores (EVRARD; NAMMOUR; DOUROV, 1995; LIBOON; FUNKHOUSER; TERRIS, 1997; ZEINOUN et al., 2001; FREITAS et al., 2002). Dentre estes grupos, a celularidade observada no tecido conjuntivo foi mais expressiva nos animais do grupo CO<sub>2</sub>. Este fato pode ser justificado devido este tipo de radiação laser reduzir a produção de fibras colágenas o que confirma os resultados encontrados por Fisher et al. (1983) e Romanos, Siar e Toh (1999).

É importante salientar que nos grupos tratados com bisturi elétrico e radiação laser foram observadas numerosas fibras musculares em processo de degeneração ou com alteração estrutural, localizadas principalmente subjacentes ao tecido conjuntivo neoformado. Esta alteração pode ser justificada pela intensa absorção de energia no local tratado. Possivelmente, esta energia tenha se dissipado facilmente para as regiões mais profundas, em razão da presença de extensas áreas de tecido necrótico na superfície da lesão. Esta hipótese está baseada nas observações de WELCH et al. (1989) e CAREW et al. (1998) que quanto maior for o poder de absorção de energia da radiação laser pelos tecidos, menores serão os danos nas áreas adjacentes (WELCH et al., 1989) e o grau deste dano é dependente do tipo de tecido irradiado (CAREW et al., 1998).

Em relação à distribuição e organização das fibras musculares esqueléticas formadas, foi notório que o grupo BC mostrou maior expressividade na comparação com os demais grupos nos períodos de sete, 14 e 21 dias. Além disso, foi verificado aumento progressivo na densidade das fibras musculares em todos os grupos nos períodos propostos. Entretanto, a análise histomorfométrica identificou diferença estatisticamente significativa na densidade das fibras musculares esqueléticas formadas somente no período de 14 dias nos animais do grupo BC, quando comparado com os grupos BE ( $p < 0,01$ ), CO<sub>2</sub> ( $p < 0,001$ ) e Nd:YAG ( $p < 0,01$ ). É provável que este fato seja devido ao grande dano tecidual ocorrido nos períodos iniciais do tratamento, o qual foi potencializado pelos efeitos indesejáveis do bisturi elétrico e de ambos os tipos de radiação laser. Essa constatação, em relação ao dano tecidual, foi também comprovada histologicamente por Small et al. (1979), Fisher et al. (1983), Clayman e Kuo (1997), Fortune et al. (1998) e Friesen et al. (1999).

Diante do exposto, ressalta-se que os resultados clínicos, histomorfológicos, assim como a estatística da histomorfometria obtidos no presente estudo incentivam a continuidade desta linha de pesquisa para que, cada vez mais, se alcance melhores conhecimentos, principalmente, dos efeitos dos diferentes tipos de radiação laser de alta potência sobre os mecanismos do processo de reparo tecidual, conduzindo a diminuição do tempo necessário ao restabelecimento da função e objetivando maior conforto ao paciente.

CONCLUSÕES



## 7 CONCLUSÕES

De acordo com a metodologia utilizada e com base nos resultados obtidos foi possível concluir que:

- Na análise clínica da evolução do processo de reparação observou-se área tratada completamente reparada no período de 21 dias em todos os grupos;
- Na análise histomorfológica, as fibras musculares esqueléticas apresentaram melhor organização e a dinâmica do processo de reparação tecidual foi mais rápida no grupo bisturi convencional;
- Entre os grupos radiação laser, a organização tecidual foi melhor observada no grupo radiação laser de Nd:YAG e, a vascularização, no grupo radiação laser de CO<sub>2</sub>.
- A densidade de fibras musculares esqueléticas neoformadas aumentou significativamente no grupo bisturi convencional quando comparado com os grupos bisturi elétrico, radiação laser CO<sub>2</sub> e radiação laser Nd:YAG, no período de 14 dias;
- Houve aumento progressivo da densidade de fibras musculares esqueléticas neoformadas durante a evolução do processo de reparação tecidual em todos os grupos.

REFERÊNCIAS



## REFERÊNCIAS<sup>3</sup>

ALAMILLOS-GRANADOS, F. J.; NAVAL-GIAS L.; DEAN-FERRER, A.; ALONSO DEL HOYO, J. R. Carbon dioxide laser vermilionectomy for actinic cheilitis. **J Oral Maxillofac Surg**, v.51, n.2, p.118-21, Aug. 1993.

ANDRADE, Z. A. Tecido conjuntivo, reparo, regeneração e cicatrização. *In*: MONTENEGRO, M. R.; FRANCO, M. **Patologia: Processos Gerais**. 4ed. São Paulo: Atheneu, 1999. Cap.8, p.135-151.

ARASSHIRO, D. S.; RAPLEY, J. W.; COBB, C. M.; KILLOY, W. J. Histologic evaluation of porcine skin incisions produced by CO<sub>2</sub> laser, electrosurgery, and scalpel. **Int J Period Dent**, v.16, p.479-91, Oct. 1996.

BARAK, S.; KAPLAN, I.; ROSENBLUM, I. The use of the CO<sub>2</sub> laser in oral and maxillofacial surgery. **J Clin Laser Med Surg**, v.8, n.5, p.69-70, Oct. 1990.

BLOTNICK, S.; PEOPLES, G. E.; FREEMAN, M. R.; EBERLEIN, T. J.; KLAGSBRUN, M. T lymphocytes synthesize and export heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor and basic fibroblast growth factor, mitogens for vascular cells and fibroblasts: Differential production and release by CD4+ and CD8+ T cells. **Proc Nat Acad Sci**, v. 91, p. 2890-2894, Apr. 1994.

BRADLEY, P. F. A review of the use of the neodymium YAG laser in oral and maxillofacial surgery. **Br J Oral Maxillofac Surg**, v.35, p.26-35, Feb. 1997.

BRISSETT, A. E.; HOM, D. B. The effects of tissue sealants, platelet gels, and growth factors on wound healing. **Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg**, v.11, p.245-250, Aug. 2003.

BROUGHTON, G.; JANIS, J. E.; ATTINGER, C. E.; The basic science of wound healing. **Plast Reconstr Surg**, v.117, n.7, p.12-34, Jun. 2006.

CAMACHO-ALONSO, F.; LÓPEZ-JORNET, P. Clinical-pathologic study of the healing of wounds provoked on the dorso-lingual mucosa in 186 albino rats. **Otolaryngol Head and Neck Surgery**, v.138, p.119-124, Jan. 2007.

---

<sup>3</sup> Texto redigido conforme as normas de formatação da ABNT(NBR 6023- agosto/2002).

CANTATORE, J.; KRIEGEL, D. Laser surgery: An approach to the pediatric patient. **J Am Dermatol**, v. 50, p.165-184, Jan. 2004.

CAREW, J.F.; WARD, R. F.; LaBRUNA, A.; TORZILLI, P. A.; SCHLEY, W. S. Effects of scalpel, electrocautery, and CO<sub>2</sub> and KTP lasers on wound healing in rat tongues. **Laryngoscope**, v.108,n.3,p.373-80, Mar.1998.

CATONE, G. A.; ALLING III, C. C. Laser management of vascular and pigmented lesions. *In*:\_\_\_\_. **Laser applications in oral and maxillofacial surgery**. Philadelphia: Saunders, 1997. cap.9, p.169-170.

CRUZ-FILHO, M.; MAIA, C. C.; ABRAHÃO, S.; BAPTISTA SILVA, J. C. C.; GOMES, P.O.; SOUFEN, M. A. et al. Efeitos do oleato de etanolamina na parede venosa, de cães. **Acta Cir Bras**, v.17, n.5, p. 317-25, set/out. 2002.

CLAYMAN, L.; KUO, P. **Lasers in maxillofacial surgery and dentistry**. New York: Thieme, 1997. 184p.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. Reparo dos tecidos: crescimento celular, fibrose e cicatrização das feridas. *In*: \_\_\_\_\_ **Robbins: Patologia estrutural e funcional**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. Cap.4, p.79-100.

DEPPE, H.; HORCH, H. H. Current status of laser applications in oral cranio-maxillofacial surgery. **Med Laser Applic**, v.22, p.39-42, Feb. 2007.

EMING, S. A.; BRACHVOGEL, B.; ODORISIO, T.; KOCH, M. Regulation of angiogenesis: Wound healing as a model. **Progr Histochem Cytochem**, v.42, p.115-170, Aug. 2007.

ENGELHARDT, E.; TOKSOY, A.; GOEBELER, M.; DEBUS, S.; BRÖCKER, E-B.; GILLITZER, R. Chemokines IL-8, GRO $\alpha$ , MCP-1, IP-10, and Mip are sequentially and differentially expressed during phase-specific infiltration of leukocyte subsets in human wound healing. **Am J Pathol**, v. 153, n.6, p.1849-1860, Dec. 1998.

ENOCH, S; LEAPER, D. J. Basic science of wound healing. **Surgery**, v.26, n.2, p.31-36, Mar. 2007.

EVARD, L; NAMMOUR, S.; DOUROV, N. Scanning electron microscopic and immunocytochemical studies of contraction during secondary CO<sub>2</sub> laser wound healing in rat tongue mucosa. **J Oral Pathol Med**, v.25, p.72-77, Feb. 1996.

FERREIRA, L.; NARY FILHO, H.; CARVALHO JÚNIOR, J. A. R. Aplicação do laser em Odontologia: um enfoque buco-maxilo-facial. **Salusvita**, v.15, n.1, p.237-255, 1996.

FISHER, S. E ; FRAME, J. W. ; BROWNE, R. M. ; TRANTE, R. M. A comparative histological study of wound healing following CO<sub>2</sub> laser and conventional surgical excision of canine buccal mucosa. **Arch Oral Biol**, v.28, n.4, p.287-291, 1983.

FISHER, S. E.; FRAME, J. W. The effects of the carbon dioxide surgical laser on oral tissues. **Br J Oral Maxillofac Surg**, v.22, p.414-425, Dec. 1984.

FORTUNE, D. S.; HUANG, S.; SOTO, J.; PENNINGTON, B.; OSSOFF, R. H.; REINISCH, L. Effect of pulse duration on wound healing using a CO<sub>2</sub> laser. **Laryngoscope**, v.108, n. 6, p. 843-8, Jun. 1998.

FRAME, J. W. Recent progress with the CO<sub>2</sub> laser in oral surgery. **International Congress Series**, v. 1248, p.3-7, 2003.

FREITAS, A. C.; PINHEIRO, A. L. B.; OLIVEIRA, M. G.; RAMALHO, L. M. P. 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**, v.20, n.4, p.221-225, Aug. 2002.

FRIESEN, L.R.; COBB, C. M.; RAPLEY, J. W.; FORGAS-BROCKMAN, L.; SPENCER, P. Laser irradiation of bone: II. Healing response following treatment by CO<sub>2</sub> and Nd: YAG lasers. **J Periodontol**, v.70, p.75-83, Jan. 1999.

GABBIANI, G. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. **J Pathol** , v.4, p.500-3, Jul. 2003.

GOMES, M. F.; ANJOS, M. J. S.; SANTOS, V. W.; NOGUEIRA, T. O.; CATANZARO- GUIMARÃES, S. A. Autogenous demineralized dentin matrix for tissue engineering applications: radiographic and histomorphometric studies. **Int J Oral Maxillofac Impl**, v.17, n.4, p.488-497, Jul./Aug. 2002.

GORTI, G. K.; KOCH, J. Modulation of wound healing and scar formation. **Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg**, v.10, p.287-291, 2002.

GUTTKNECHT, N.; FRANZEN, R. **O laser: função, interação e segurança**. São Paulo: Quintessence, 2004. 320p.

HESS, C. L.; HOWARD, M. A.; ATTINGER, C. E. A review of mechanical adjuncts in wound healing: hydrotherapy, ultrasound, negative pressure therapy, hyperbaric oxygen, and eletrostimulation. **Ann Plast Surg**, v.51, p.210-218, Aug. 2003.

HINZ, B.; GABBIANI, G. Mechanisms of force generation and transmission by myofibroblasts. **Curr Opin in Biotechnology**, v.14, p.538-546, Dec. 2003.

HOLLINWORTH, H. Wound care. **Nursing Times**, v.90, n.7, p.84-86, Feb. 1994.

HORCH, H. H.; DEPPE, H. New aspects of lasers in oral and craniomaxillofacial surgery. **Med Laser Applic**, v.20, p.7-11, 2005.

HUARD, J.; LI, Y.; FU, F. H. Muscle injuries and repair: current trends in research. **J Bone Joint Surg**, v.84a, n. 5, p.822-830, May. 2002.

JOHNSTONE, C. C.; FARLEY, A. C. The physiological basiss of wound healing. **Nurs Stand**, v.19, n.43, p.59-65, Jul. 2005.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 10ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 488p.

KARDOS, T. B; HOLT, T.; FERGUSON, M. M. Histological evaluation of the effect of a miniature carbon dioxide laser on oral mucosa. **Int J Maxillofac Surg**, v.18, n.2, p.117-120, Apr.1989.

KERR, J. B. **Atlas de Histologia Funcional**. São Paulo: Artes Médicas. 2000. 402p.

LENHNERT, M. W. Lasers in medicine and dentistry. **North Dental**, p.17-21, Jan./Feb.1996.

LI, J.; CHEN, J.; KIRSNER, R. Pathophysiology of acute wound healing. **Clin Dermatol**, v.25, p.9-18, Jan./Feb. 2007.

LIBOON, J.; FUNKHOUSER, W.; TERRIS, D.J. A comparison of mucosal incisions made by scalpel, CO<sub>2</sub> laser, eletrocautery, and constant-voltage eletrocautery. **Otolaryngol Head Neck Surg**, v.116, p.379-385, Mar. 1997.

LIPPERT, B. M.; TEYMOORTASH, A.; FOLZ, B. J.; WERNER, J. A. Wound healing after laser treatment of oral and oropharyngeal cancer. **Lasers Med Sci**, v.18, p.36-42, 2003.

LUOMANEN, M. A comparative study of healing of laser and scalpel incision wounds in rat oral mucosa. **Scand J Dent Res**, v.95, n.1, p.65-73, 1987.

LUOMANEN, M.; LEHTO, V.P.; MEURMAN, J.H. Myofibroblasts in healing laser wounds of rat tongue mucosa. **Arch Oral Biol**, v.33, n.1, p.17-23, 1988.

MASAKI M.; OBARA K.; SUZUKI, S.; ORIKASA, K.; MITSUHASHI, H.; IWASAKI, K. et al. The destructive effects of sclerosant ethanolamine oleate on mammalian vessel endothelium. **Gastroenterol Jpn**, v.25, p.230-235, Apr. 1990.

McANULTY, R.J. Fibroblasts and myofibroblasts: their source, function and role in disease. **Int J Biochem Cell Biol**, v.39, p.666-671, Nov. 2007.

McFARLAND, D. C.; SINGH, Y. N.; JOHNSON, A. D.; PESALL, J. E.; GILKERSON, K. K.; VANDER WAL, L. S. Isolation and characterization of myogenic satellite cells from the muscular dystrophic hamster. **Tissue Cell**, v.32, n.3, p.257-265, Jun. 2000.

MIDWOOD, K. S.; WILLIAMS, L. V.; SCHWARZBAUER, J.E. Tissue repair and the dynamics of the extracellular matrix. **Int J Biochem Cell Biol**, v.36, n.6, p.1031-1037, Jun. 2004.

MOROSOLLI, A. R. C.; SCHUBERT, M.M.; NICCOLI-FILHO, W. Surgical treatment of erythroleukoplakia in lower lip with carbon dioxide laser radiation. **Lasers Med Sci**, v.21, p.181-184, Sep. 2006.

MONTES, G. S. Structural biology of the fibres of the collagenous and elastic system. **Cell Biol Int**, London, v.20, n.1, p.15-27, Jan. 1996.

MYERS, T. D.; MYERS, W. D.; STONE, R. M. First soft tissue study utilizing a pulsed Nd:YAG dental laser. **North West Dent**, v.68, n.2, p.14-17, Mar./ Apr. 1989.

NANCI, A.; TEN CATE, A. R. **Ten Cate's Oral Histology: Development, structure, and function**. 6<sup>th</sup> ed. St. Louis: Mosby Inc, 2001. 445p.

NICCOLI-FILHO, W.; OKAMOTO, T. Effect of the helium-neon laser on the healing of extraction wounds: a histological study in rats. **J Lasers Applic**, v.6, p.237-40, 1994.

NICCOLI-FILHO, W. ; FURLANI, J. C. ; SCHWAB, C. ; RALDI, F.V. ; EDUARDO, C. P. Intrapulpar temperature during continuous CO<sub>2</sub> laser irradiation in human molars: an in vitro study. **J Lasers Applic**, v.9, p.291-294, 1997.

NICCOLI-FILHO, W.; SAMPAIO, T.A.; GUIMARÃES-FILHO, R. Efeitos da radiação laser de dióxido de carbono em tecido ósseo: estudo macroscópico em ratos. **Pesq Odontol Bras**, v.15, n.2, p.127-32, abr./jun.2001.

NICCOLI-FILHO, W.; MOROSOLLI, A. R. C. CO<sub>2</sub> laser treatment of actinic cheilitis associated with squamous-cell carcinoma of lower lip. **J Oral Laser Applic**, v.3, p.251-253, 2003.

PAES-JÚNIOR T. A. NICCOLI-FILHO W. Clinical comparition between conventional suture and vaporization with carbon dioxide laser in rat's skin. **J Clin Laser Med Surg**, New York, v.19, p.319-324, Dec. 2001.

PATROCINIO, M. C.; NICCOLI-FILHO, W. Effects of carbon dioxide laser (CO<sub>2</sub>) in oral mucosa: histologic study in rats. **Pós-Grad Rev Odontol São José dos Campos**, v.3, n.2, p.81-89, Jul./Dez. 2000.

PRAKASH, S.; PAUL, W. E.; ROBBINS, P. W. Fibrosin, a novel fibrogenic cytokine, modulates expression of myofibroblasts. **Exp Mol Pathol**, v.82, p.42-48, Feb. 2007.

PATEL, C. K. N. Selective excitation through vibrational energy transfer and optical maser action in N<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>. **Physical Review Letters**, v.13, n.21, p.617-619, Nov. 1964.

PICK, R. M.; COLVARD, M. D. current status of lasers in soft tissue dental surgery. **J Periodontol**, v.64, p.589-602, Jul. 1993.

PINHEIRO, A. L.; NEVES, J.C.; CASTRO, J. F. L.; SANTOS, J. Z., ZANIN, F. A.; OLIVEIRA, A. M. Comparison of the effects of the CO<sub>2</sub> and chlorohexidine on the decontamination of infected cutaneous wounds: a histologic study in rats. **J Clin Laser Med Surg**, v.20, n.3, p.123-127, 2002.

POGREL, M. A. The carbon dioxide laser in soft tissue preprosthetic surgery. **J Prosthetic Dent**, v. 61, n.1/2, 203-8, Feb. 1989.

ROBINSON, J.K. et al. Wound healing in porcine skin following low-output carbon dioxide laser irradiation of the incision. **Ann Plast Surg**, v.18, n.6, p.499-505, June 1987.

ROMANOS G. E., PELEKANOS, S., STRUB, J. R. Effects of Nd:YAG laser on wound healing processes: clinical and immunohistochemical findings in rat skin. **Lasers Surg Med**, v.16, n.4, p.368-379, 1995.

ROMANOS, G. E.; NENTWIG, G. H. Present and future of lasers in oral soft tissue surgery: clinical applications. **J Clin Laser Med Surg**, v. 14, n.4, p.179-84, 1996.

ROMANOS G. E., SIAR, C.H.; TOH, C.G. 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.

ROSSMANN, J. A.; GOTTLIEB, S.; KOUDELKA, B. M.; McQUADE, M. J. Effects of CO<sub>2</sub> laser irradiation on gingiva. **J Periodontol** , v.58, n.6, p.423-425, June. 1987.

RUNGGER-BRÄNDLE, E.; GABBIANI, G. The role of cytoskeletal and cytocontractile elements in pathologic process. **Am J Pathol**, v.10, n.3, p.361-391, Mar. 1983.

SARSAM, S. E.; ELLIOTT, J. P.; LAM, G.K. Management of wound complications from cesarean delivery. **Obstet Gynecol Surv**, v.60, n.7, p.462-473, Jul. 2005.

SINHA, V. K.; GALLANGHER, L. A; Effects of steel scalpel, ultrasonic scalpel, CO<sub>2</sub> laser, and monopolar and bipolar electrosurgery on wound healing in guinea pig oral mucosa. **Laryngoscope**, v.113, n.2, p.228-236, Feb. 2003.

SMALL, I. A.; OSBORN, T.P.; FULLER, T.; HUSSAIN, M.; KOBERNICK, S. Observation of carbon dioxide laser and bone bur in the osteotomy of rabbit tibia. **J Oral Surg**, v.37, p.159-66, Mar. 1979.

SMITH, K.; RENNIE, M. J. New approaches and recent results concerning human-tissue collagen synthesis. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v.10, p.582-590, Sep. 2007.

SULLINS, K. E. Lasers and wound healing: practical uses. **Clin Tech Equine Pract**, v.3, p.182-187, 2004.

THUAKSUBAN, N.; NUNTANARANONT, T. A comparative study of postoperative pain using carbon dioxide laser and scalpel in maxillofacial soft tissue surgery. **Int Congress Series**, v.1248, p.377-381, 2003.

UENO, C.; HUNT, T.K.; HOPF, H.W. Using physiology to improve surgical wound outcomes. **Plast Reconstr Surg**, v.117, n.7, p.59-67, Jun. 2006.

VASCONCELLOS, B. C. E.; FROTA, R.; PEREIRA, J. R. D.; FREITAS, L. H. M.; SANTOS, L. K. M. O uso da eletrocirurgia em procedimentos bucais. **Rev Cir Traumat Buco-Maxilo-Fac**, v.3, n.3, p.35-42, jul./set. 2003.

WALFISCH, S; MNITENTAG, H.; BARUCHIN, A.M.; SAGI, A. Nd:YAG and CO<sub>2</sub> lasers for the treatment of pilonidal sinuses: advantages over traditional techniques. **Med Laser Appl**, v.19, p.155-159, 2004.

WALSH, L. J. Pulpal temperature changes during low-power hard-tissue CO<sub>2</sub> laser procedures. **Braz Dent J**, v.7, n.1, p.5-11, 1996.

WELCH, A. J ; PEARCE, J.A. ; DILLER, K.R. ; YOON, G. ; CHEONG, W. F. Heat generation in laser irradiated tissue. **J Biomech Eng**, v.111, n.1, p.62-8, Feb. 1989.

WILDER-SMITH, P.; ARRASTIA, A. M.; LIAW, L. H.; BERNS, M. Incision properties and thermal effects of three CO<sub>2</sub> lasers in soft tissue. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v.79, n.6, p.685-691, June. 1995.

YU, W.; NAIM, J. O.; LANZAFAME, R. J. Expression of growth factors in early wound healing in rat skin. **Lasers Surg Med**, v.15, n.3, p.281-289, 1994.

ZAMMIT, P. S.; HESLOP, L.; HUDON, V.; ROSENBLATT, J. D.; TAJBAKSH, S.; BUCKINGHAM, M.E. et al. Kinetics of myoblast proliferation show that resident satellite cells are competent to fully regenerate skeletal muscle fiber. **Exp Cell Res**, v.28, p.39-49, 2002.

ZANETTINI, I; ZANETTINI, R. M.; GOLLO, G. Escleroterapia como alternativa de tratamento de lesões vasculares bucais. **Clin Pesq Odontol**, v.2, n.2, p.119-126, 2005.

ZEINOUN, T.; NAMMOUR, S.; DOUROV, N.; AFTIMOS, G.; LUOMANEN, M. Myofibroblasts in healing laser excision wounds. **Lasers Surg Med**, v.28, n.1, p.74-79, 2001.

ANEXOS



ANEXO A – Carta de solicitação ao Prof. Titular Dr. Walter Niccoli Filho para colaboração na execução da parte experimental desta pesquisa na FOSJC - UNESP.



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
PÓS-GRADUAÇÃO

Of. PGO 426/06

Porto Alegre, 21 de setembro de 2006.

Prezado Professor:

Vimos solicitar vossa colaboração para execução da parte experimental do projeto de pesquisa intitulado “Análise histomorfométrica da reparação em língua com necrose induzida submetida a tratamento cirúrgico: estudo em hamsteres”, de Aline Rose Cantarelli Morosoli, aluna do doutorado em Odontologia, área de Estomatologia Clínica. De forma simplificada, o estudo prevê a avaliação da reparação tecidual relacionando-se os aspectos clínicos e análise histomorfométrica do tratamento cirúrgico de necrose induzida em borda lateral de língua de hamsteres utilizando-se os métodos bisturi convencional, bisturi elétrico e radiação laser de Nd:YAG e de CO<sub>2</sub>. Os animais serão sacrificados nos tempos 7, 14, 21 e 28 dias pós-cirúrgicos. Contamos com vossa disponibilidade para dar seguimento à referida pesquisa. Ressaltamos que os trabalhos contarão com a vossa autoria, bem como a co-participação da FOSJC – UNESP.

Na oportunidade, reiteramos nossos protestos de estima e consideração.

Atenciosamente,

  
Prof. Marcos Túlio Mazzini Carvalho  
Diretor

  
Profa. Dra. Nilza Pereira da Costa  
Coordenadora Programa de  
Pós-Graduação em Odontologia

Ilmo. Sr.  
Prof. Titular Walter D. Niccoli Filho  
Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal  
Disciplina de Semiologia  
Faculdade de Odontologia da FOSJC - UNESP

**PUCRS**

**Campus Central**  
Av. Ipiranga, 6681 – P. 06 – sala 209 – CEP: 90619-900  
Fone: (51) 3320-3538 – Fax (51) 3320-4103  
E-mail: odontologia-pg@pucrs.br  
www.pucrs.br/odonto/pos

ANEXO B – Carta-resposta do Prof. Titular Dr. Walter Niccoli Filho referente à solicitação para colaboração na execução da parte experimental desta pesquisa na FOSJC- UNESP.



**GRUPO ACADÊMICO DE ESTUDOS E PESQUISAS COM  
LASER NA ODONTOLOGIA**

São José dos Campos, 23 de outubro de 2006

Ilma. Sra.  
Profa. Dra. Nilza Pereira da Costa  
MD Coordenadora do Curso de Pós-Graduação  
FO-PUCRS

Prezado Professora

Em resposta ao ofício PGO 426/06 datado de 21/09/2006 enviado por V.Sa., venho informar que, com prazer, coloco a disposição da aluna Aline Rose Cantarelli Morosolli todo suporte clínico, técnico e didático para que a mesma desenvolva a parte experimental do Projeto de Pesquisa intitulado "*Análise histomorfométrica da reparação em língua com necrose induzida submetida a tratamento cirúrgico: estudo em hamsteres*" sob nossa responsabilidade.

Desde já me coloco a disposição no sentido de dirimir quaisquer dúvidas e aproveito a oportunidade para enviar-lhe meus protestos de consideração e respeito.

Atenciosamente,

Prof. Titular Walter Niccoli Filho  
Coordenador

ANEXO C - Documento comprobatório da aprovação da pesquisa pela Comissão Científica e de Ética da FOSJC - UNESP.

 **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

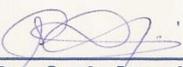
Av. Eng. Francisco José Longo, 777 - Jd. São Dimas  
CEP 12201-970 - F. (12) 3947-9028  
Fax (12) 3947-9010 / [suely@fosjc.unesp.br](mailto:suely@fosjc.unesp.br)

---

 **CERTIFICADO**  
Comitê de Ética em Pesquisa-Local

**CERTIFICAMOS**, que o protocolo nº **021/2006-PA/CEP**, sobre **“Análise histomorfométrica da reparação em língua com necrose induzida submetida a tratamento cirúrgico: Estudo em Hamsters”**, sob a responsabilidade de **WALTER DOMINGOS NICCOLI FILHO**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

São José dos Campos, 19 de setembro de 2006.

  
\_\_\_\_\_  
**Profa. Dra. Suely Carvalho Mutti Naressi**  
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa-Local

ANEXO D - Documento comprobatório da aprovação da pesquisa pela Comissão Científica e de Ética da FOPUCRS.



*Comissão Científica e de Ética  
Faculdade da Odontologia da PUCRS*

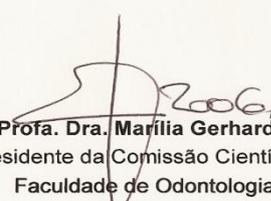
**Porto Alegre 14 de novembro de 2006**

**O Projeto de: Pesquisa**

**Protocolado sob n°:** 0089/06  
**Intitulado:** Análise histomorfométrica da reparação em língua com necrose induzida submetida a tratamento cirúrgico: estudo em hamsteres  
**Pesquisador Responsável:** Profa. Dra. Elaine Bauer Veeck  
**Pesquisadores Associados:** Aline Rose Cantarelli Morosolli  
**Nível:** Doutorado

Foi **aprovado** pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da PUCRS em 10 de novembro de 2006.

*Este projeto deverá ser imediatamente encaminhado ao CEP/PUCRS*

  
**Profa. Dra. Marília Gerhardt de Oliveira**  
Presidente da Comissão Científica e de Ética da  
Faculdade de Odontologia da PUCRS

Av. Ipiranga, 6681, Prédio 06 sala 209  
Porto Alegre /RS – Brasil – Cx. Postal: 1429  
90619-900

Fone/Fax: (51) 3320-3538  
e-mail: [odontologia-pg@pucrs.br](mailto:odontologia-pg@pucrs.br)

ANEXO E - Documento comprobatório da aprovação da pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS.



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Ofício 0076/07-CEP

Porto Alegre, 15 de janeiro de 2007.

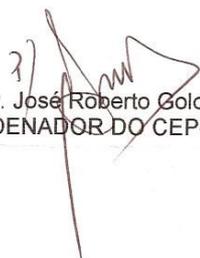
Senhor(a) Pesquisador(a):

O Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa, registro CEP 06/03494, intitulado: **“Análise histomorfométrica da reparação em língua com necrose induzida submetida a tratamento cirúrgico: estudo em hamsters”**.

Sua investigação está autorizada a partir da presente data.

Relatórios parciais e final da pesquisa devem ser encaminhados a este CEP.

Atenciosamente,

  
Prof. Dr. José Roberto Goldim  
COORDENADOR DO CEP-PUCRS

Ilmo(a) Sr(a)  
Profa Dra Elaine Bauer Veeck  
N/Universidade

**PUCRS** Campus Central  
Av. Ipiranga, 6690 – 3º andar – CEP: 90610-000  
Fone/Fax: (51) 3320-3345  
E-mail: [cep@pucrs.br](mailto:cep@pucrs.br)  
[www.pucrs.br/prppg/cep](http://www.pucrs.br/prppg/cep)