



AUTARQUIA ASSOCIADA A UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO

LÚCIA REGINA DE ARAÚJO CAVALCANTI TEIXEIRA

**Análise da Proliferação de Queratinócitos Durante o Reparo de
Incisões Cirúrgicas Realizadas por Bisturi Convencional, Bisturi
Elétrico, *Laser* de CO₂ e *Laser* de Diodo**

**São Paulo
2012**





AUTARQUIA ASSOCIADA A UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO

LÚCIA REGINA DE ARAÚJO CAVALCANTI TEIXEIRA

**Análise da Proliferação de Queratinócitos Durante o Reparo de Incisões
Cirúrgicas Realizadas por Bisturi Convencional, Bisturi Elétrico,
*Laser de CO₂ e Laser de Diodo***

Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Mestre Profissional em *Laser* em
Odontologia

Orientadora:
Prof^a. Dr^a. Luciane Hiramatsu Azevedo

Co-orientadora:
Prof^a. Dr^a. Martha Ferreira Vieira

São Paulo

2012



“Os ideais que iluminaram o meu caminho são a bondade, a beleza e a verdade”.

Albert Einstein

Dedicatória

Aos meus pais, Amauri e Lucinha, vocês não somente me educaram, mas edificaram os valores que conduzem toda a minha vida.

À Mainha, minha eterna gratidão, você é minha fonte de amor, de equilíbrio e de paciência. Só preciso de sua sabedoria.

Ao meu esposo Carlos Egmont Júnior, seu apoio e compreensão foram essenciais. Obrigada principalmente pela persistência em me fazer crer que o amor está acima de tudo.

Aos meus FILHOS Egmont, Bruna e Eduarda, pela amizade, carinho, apoio e incentivo, por de todas as horas que jamais me deixaram desistir dos meus objetivos, cada um me ajudou de alguma forma muito especial a realizar este mestrado e fazem parte da minha vida com muito orgulho. É por vocês que procuro me tornar um ser humano melhor, seus gestos de carinho e gratidão dão sentido a minha vida.

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

Àquele que permitiu que todas as coisas acontecessem, que nós estivéssemos aqui neste momento, desvendando a ciência da vida, Deus.

À minha orientadora, Profa. Dra. Luciane Hiramatsu Azevedo, dedicação, carinho, amizade e pelas incansáveis e constantes informações fornecidas, não só neste trabalho mas em todo o decorrer do curso. Você esteve sempre presente, mesmo distante!

À Prof^a. Dr^a. Martha Vieira, minha coorientadora, com seus ensinamentos primordiais da física me proporcionaram aprendizado que perdurarão por toda minha vida. Obrigada pela paciência: sua tranquilidade é meu esteio.

À Prof^a. Dr^a. Luciana Correa, patologista, pela paciência e por acreditar na minha seriedade frente a este trabalho. Sem sua colaboração seria impossível a realização desta dissertação.

À Prof^a. Dr^a. Denise Maria Zezell, sua formação e informação engrandece a educação do nosso país e de quem teve oportunidade de ouvi-la. Pessoalmente sua importante ajuda durante o decorrer do curso, foi responsável por esta etapa da minha vida.

À FAPESP, pelo auxílio oferecido a essa pesquisa desde 2005 (Processo 2004/06794-0).

Aos Profs. Drs. Suzana Cantanhede Orsini Machado de Sousa, Marina Helena Cury Gallottini, Décio dos Santos Pinto Júnior do laboratório de Patologia Bucal da FOU SP pela disponibilização do microscópio para as fotografias desta dissertação.

Ao Prof. Dr. Fábio Daumas Nunes, do laboratório de Patologia Bucal da FOU SP, pela atenção e preciosa ajuda nas fotografias.

Prof^a Dr^a Claudia Strefezza professora e amiga, pelas valiosas orientações nas apresentações das aulas e do seminário.

Prof^a Dr^a Sheila Gouw-Soares pela confiança, pela presença e pelo ensino tão eficiente em nossas clínicas.

Às Prof^a. Dr^a. e amigas Dione do Vale e Niedje Siqueira minhas irmãs-amigas amizade sincera, carinho, e confiança em todos os momentos. Isto foi fundamental tanto para meu crescimento pessoal como para a realização deste mestrado.

Ao Prof. Dr. Gessé Eduardo Calvo Nogueira, pelo apoio em todos os momentos, sempre muito solícito a ajudar transmitindo seus conhecimentos com dedicação.

Ao Prof. Dr. Carlos de Paula Eduardo, o seu entusiasmo de mestre, acolhimento e atenção foram essenciais para minha escolha do estudo do laser como objetivo principal na minha vida profissional.

À Prof^a. Dra. Sheila Andrade Oliveira – FIOCRUZ - por ter aceitado ser colaboradora deste trabalho, me recebendo, e proporcionando orientação, conhecimento e principalmente encorajamento em momentos de grande importância na conclusão desta dissertação.

À Lilliane Souza, querida por todos, sempre paciente nos ajudando em todos os momentos.

À Gê e Elaine, por atender nossos inúmeros pedidos nas clínicas, meus eternos agradecimentos.

Aos demais Professores e colegas do Centro de Lasers e Aplicações, pelo conhecimento e amizade que pude adquirir com vocês neste mestrado.

Ao Roni, do Ageu Magalhães, pelo apoio em todos os momentos, sempre muito solícito.

Aos Profs. do IMIP, Dr. Horácio Fittipaldi e equipe da patologia, por compartilharem seu espaço no laboratório de patologia do hospital, e conhecimento compartilhado, com o único intuito de colaborar.

Aos meus amigos mestrandos, que contribuíram para meu crescimento pessoal, pela amizade e apoio. Meninas, pelas risadas e conversas que tivemos! Ter conhecido vocês foi muito importante.

Aos meus amados irmãos Amauri e Silvia, meus familiares e meus amigos, obrigada por todo carinho, pela força e pela torcida incansáveis do meu sucesso.

Ao IPEN, ao LELO e seus funcionários, pela dedicação demonstrada me ajudando durante estes anos de estudo.

Rita, Aida e Paulo, Karina e Ricardo, e Susanna, o acolhimento e o aconchego de seus lares renovavam minhas forças todas as noites quando eu chegava nas casas de vocês.

Por tudo, meu muito obrigada !!!!!!!

*Se um dia, já homem feito e realizado, sentires que a terra cede a teus pés,
que tuas obras desmoronam, que não há ninguém à tua volta para
te estender a mão, esquece a tua maturidade passa pela
tua mocidade, volta à tua infância e balbúcia, entre
lágrimas e esperanças, as últimas palavras
que sempre te restarão na alma:*

minha mãe, meu pai.

Rui Barbosa

ANÁLISE DA PROLIFERAÇÃO DE QUERATINÓCITOS DURANTE O
REPARO DE INCISÕES CIRÚRGICAS REALIZADAS POR BISTURI
CONVENCIONAL, BISTURI ELÉTRICO, *LASER* DE CO₂ E *LASER* DE DIODO

Lúcia Regina de Araújo Cavalcanti Teixeira

RESUMO

O *laser* de dióxido de carbono (CO₂) e o *laser* de diodo de alta potência são largamente utilizados nos procedimentos de cirurgia oral. No entanto, o impacto na reparação tecidual pós ablação de tecido e lesão térmica causada por esses *lasers* não é bem estabelecido. O objetivo deste estudo foi comparar o índice de proliferação celular no epitélio das incisões induzidas em língua de ratos através da imunomarcagem utilizando o (PCNA) antígeno nuclear de proliferação celular. Foram realizadas incisões lineares padronizadas por bisturi convencional, bisturi elétrico, *laser* de CO₂ (2W), *laser* de CO₂ (4W), *laser* de diodo (2W) e *laser* de diodo (4W). Testes de imuno-histoquímica utilizando anticorpos anti-PCNA foram realizados para análise de proliferação de queratinócitos a 0h e 1, 2, 3, 7 e 14 dias após as incisões cirúrgicas. O índice de positividade celular e a largura do epitélio nas margens das incisões foram medidos histomorfometricamente. No geral, os grupos de *Lasers* de CO₂ (2W e 4W) apresentaram maior número de células positivas do que os grupos de *Lasers* de diodo (2W e 4W), mas este número foi menor do que o observado nos grupos em que foi utilizado bisturi convencional e elétrico. No intervalo de 3 a 14 dias, o número de células positivas foi aumentando nos grupos do *laser* de diodo, mostrando-se superior ao apresentado para os grupos de bisturi convencional e elétrico. Concluindo, os *lasers* de CO₂ parecem causar um dano térmico menor que o produzido pelos *lasers* de diodo, o que interfere na proliferação de queratinócitos. Ambos os *lasers* mostraram índices de proliferação celular inferior comparado aos bisturis convencional e elétrico.

Palavras-chave: *laser* de CO₂, *laser* de diodo, PCNA, Queratinócitos, proliferação.

KERATINOCYTES PROLIFERATION ANALYSIS AFTER SURGICAL
INCISIONS PERFORMED BY CONVENTIONAL SCALPEL, ELECTRO CAUTERY,
CO₂ LASER AND DIODE LASER

Lucia Regina de Araújo Cavalcanti Teixeira

ABSTRACT

Carbon dioxide CO₂ laser and high energy diode laser are extensively applied for oral surgery procedures, but the impact on the tissue repair of tissue ablation and thermal injury caused by these lasers is not well-established. The aim of this study was to compare the cell index proliferation through proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolabeling on the epithelium of incisions induced in the rat tongue. Standardized linear incisions were performed by conventional scalpel, electro cautery, CO₂ laser (2W), CO₂ (4W), diode laser (2W), and diode laser (4W). Immunohistochemical tests using anti-PCNA antibody were performed for keratinocytes proliferation analysis at 0h and 1, 2, 3, 7 and 14 days after surgical incisions. PCNA-positive cells and the epithelium thickness area in the incisions borders were histomorphometrically measured. In general, the CO₂ lasers groups (2W and 4W) had higher number of positive cells than diode lasers groups (2W and 4W), but this number was lower than conventional scalpel and electro cautery. From 3 days to 14 days, the number of positive cells was increasing in diode laser groups, and higher than in conventional scalpel and electro cautery. In conclusion, CO₂ lasers seem to cause thermal damage that interferes with keratinocytes proliferation, but in lower level than diode lasers. Both lasers show cell proliferation indexes lower than conventional scalpel and electro cautery.

Keywords: Laser, PCNA, keratinocytes, proliferation.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Média (\pm desvio-padrão) da área epitelial (em μm^2) nas bordas da ferida para os períodos de 0h e 24h

Gráfico 2 – Média (\pm desvio-padrão) da área epitelial (em μm^2) nas bordas da ferida para os períodos de 48h e 72h

Gráfico 3 – Média (\pm desvio-padrão) da área epitelial (em μm^2) nas bordas da ferida para os períodos de 7 dias e 14 dias

Gráfico 4 – Média (\pm desvio-padrão) da área epitelial (em μm^2) nas bordas da ferida para todos os grupos e períodos experimentais

Gráfico 6 – Densidade média (\pm desvio-padrão) de queratinócitos PCNA-positivos por área epitelial (em μm^2) nos períodos experimentais de 0h e 24h

Gráfico 7 – Número médio (\pm desvio-padrão) de queratinócitos PCNA-positivos

Gráfico 8 – Densidade média (\pm desvio-padrão) de queratinócitos PCNA-positivos por área epitelial (em μm^2) nos períodos experimentais de 48h e 72h

Gráfico 9 – Número médio (\pm desvio-padrão) de queratinócitos PCNA-positivos nos períodos experimentais de 7 dias e 14 dias

Gráfico 10 – Densidade média (\pm desvio-padrão) de queratinócitos PCNA-positivos por área epitelial (em μm^2) nos períodos experimentais de 7 dias e 14 dias

Gráfico 11 – Número médio (\pm desvio-padrão) de queratinócitos PCNA-positivos segundo os grupos e períodos experimentais

Gráfico 12 – Densidade média (\pm desvio-padrão) de queratinócitos PCNA-positivos por área epitelial (em μm^2) segundo os grupos e períodos experimentais

LISTA DE FIGURAS

Fig. 2.1 – Imagem do corte da região dorsal da língua com coloração HE. Aumento original 25X

Fig. 4.4.1 calculo da área do epitélio utilizando-se software de morfometria digital em uma das bordas da ferida. Aumento original 100X

Fig. 4.4.2 quantificação dos queratinócitos PCNA-positivos no epitélio de uma das bordas da ferida. Aumento original 100X

Fig. 5.1 ilustra os cortes nos tempos 0h e 24h. Aumento original 100X

Fig. 5.2 ilustra os cortes nos tempos 48h e 72h. Aumento original 100X

Fig. 5.3 ilustra os cortes nos tempos 7 e 14 dias. Aumento original 100X

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

Et al	el alli, e outros
CO ₂	dióxido de carbono
Cm	centímetro(s)
Cm ²	centímetro(s) quadrado(s)
Ho	hólmio
Ho:YAG	matriz hospedeira YAG dopada com hólmio
mm	milímetro(s)
mm ²	milímetro(s) quadrado(s)
µm ²	micrômetro(s) quadrado(s)
Nd	neodímio
Nd:YAG	matriz hospedeira YAG dopada com neodímio
Nm	nanômetro(s)
Pixel	menor unidade
YAG	Yttrium Aluminum Garnet, granada de ítrio e alumínio
AE	área do epitélio
TCP	Total de células positivas
CA	Células/área
HE	Hematoxilina-Eosina
PCNA	Antígeno nuclear de Proliferação Nuclear

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	graus Celsius
h	hora(s)
s	segundo(s)
W	watt(s) unidade de potência
K	graus Kelvin
a*	coordenada a*
C*	croma
H*	ângulo hue
L*	luminosidade
δ	gama

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO DA LITERATURA	23
2.1 Descrição anatômica e histológica do tecido lingual	23
2.2 O reparo.....	24
2.3 Ciclo celular	26
2.4 A Imuno-histoquímica para PCNA	27
2.5 Ações do Laser nos tecidos moles	28
2.5.1 Laser de CO2	29
2.5.2 Laser de diodo	36
3 OBJETIVO	40
4 MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1 MATERIAL	42
4.1.1 Animais	42
4.1.2 Instrumentos utilizados	42
4.2 MÉTODO	43
4.2.1 Método experimental	44
4.3 IMUNO-HISTOQUÍMICA QUANTIFICAÇÃO DE PCNA.....	45
4.3.1 Técnica de imuno-histoquímica	45
4.3.2 Quantificação de PCNA	46
4.4 ANÁLISE QUANTITATIVA	47
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	49
5 RESULTADOS	50
5.2 Contagem de queratinócitos PCNA-positivos e densidade dessas células...	55
6 DISCUSSÃO	64
7 CONCLUSÕES	70
REFERÊNCIAS	71
ANEXOS	81

1 INTRODUÇÃO

Como nova especialidade na Odontologia, o *laser* tem cada vez mais espaço no Brasil e no mundo devido aos bons resultados observados em apenas 50 anos de estudos.

O *laser de CO₂* é utilizado para incisão e excisão de tecidos moles com resultados favoráveis pela eficiência, poder de incisão, ablação e boas respostas clínicas e biológicas da região irradiada.^{1,2}

O *laser* de diodo de alta potência é relativamente novo no tratamento odontológico. Esses lasers têm indicação para exérese de neoplasias benignas, processos proliferativos, desordens potencialmente cancerizáveis, e casos seletivos de lesões malignas.^{3,4,5} Possui uma tecnologia diferente, utilizando semicondutores como meio ativo. Possui comprimento de onda entre 810 a 930nm. É fortemente absorvido pela hemoglobina e tecidos pigmentados. São na maioria portáteis, práticos para o uso em clínica diária e possuem custos reduzidos em comparação com outros equipamentos de *lasers*. O sistema de entrega do feixe através de fibra óptica é indicado para diferentes aplicações cirúrgicas.

Os *lasers* de alta potência abordados neste estudo são frequentemente utilizados nos tecidos moles orais, cabendo ao profissional eleger o aparato mais adequado para o tipo de procedimento cirúrgico a ser realizado. Esses lasers apresentam vantagens como a redução do tempo operatório, melhor visualização da área cirúrgica devido à hemostasia, redução da bacteremia, menor destruição do tecido adjacente e menor contração da ferida cirúrgica no pós-operatório.^{6,7}

As principais desvantagens, no entanto, são decorrentes dos danos térmicos que podem ser minimizados utilizando-se parâmetros adequados.^{8,9}

Apesar dos benefícios apresentados, o uso do *laser* ainda é uma incógnita para muitos profissionais da área de saúde. Isso talvez possa ser explicado pela desinformação e pela velocidade do desenvolvimento dos *lasers* e suas aplicações e também devido a resultados não tão bem sucedidos, decorrentes da utilização de parâmetros inadequados ou do despreparo de alguns profissionais que trabalham com o *laser*.

Embora a literatura seja ainda escassa sobre a comparação dos efeitos das técnicas convencionais com o *laser*, alguns estudos relatados na revisão mostram que as feridas produzidas com o uso do *laser* apresentam um corte pouco

traumático, têm boa cicatrização, promovem remoção homogênea do tecido e hemostasia da área através da coagulação superficial.¹⁰

Para vários autores o uso da radiação laser não aumentou a capacidade da reparação de feridas bucais quando comparado com as técnicas cirúrgicas realizadas com bisturi convencional e bisturi elétrico,^{1, 5} entretanto, clinicamente é observado que a reparação tecidual em feridas feitas com o *laser* de CO₂ em mucosa, ocorre menor contração da cicatriz comparadas às realizadas com bisturi convencional.^{11, 12}

O uso o bisturi elétrico comparado ao bisturi convencional na incisão, respeitando as precauções e indicações, gera corrente elétrica de alta frequência quando em contato com o tecido. Alguns autores citaram como vantagens diminuição do tempo cirúrgico e depleção do fluxo sanguíneo. Esta técnica também pode causar complicações como, queimadura elétrica, podendo ocorrer no sítio cirúrgico ou no local do eletrodo, interferência eletromagnética com outros instrumentos no campo cirúrgico, deficiência no funcionamento de dispositivos cardíacos implantados e também nos implantes cocleares durante sua utilização, além de que, quando utilizado na mucosa oral, pode causar aumento da dor pós-operatória, perda de peso, atraso na reparação e, ainda, produção de fumaça contendo gases tóxicos.^{13, 14}

O mecanismo de cicatrização, frente à resposta metabólica ao trauma dos procedimentos cirúrgicos, desencadeou avanços da biologia molecular permitindo o estudo e o conhecimento de todas as etapas da cicatrização. O estudo dos efeitos dos diferentes tipos de radiação *laser* de alta potência sobre os mecanismos do processo de reparo tecidual pretende diminuir o tempo necessário ao restabelecimento da função e, principalmente, proporcionar maior conforto ao paciente.^{11, 12}

A análise histológica em derme e mucosa oral para avaliação do reparo, comparando diversos *lasers* com técnicas convencionais tem sido encontrados na literatura. Através da imuno-histoquímica, vários marcadores foram estudados para quantificação da fibronectina, do colágeno, de mastócitos, de laminina entre outros. No entanto, não há, até o momento, relato com imuno-histoquímica para PCNA independente do tecido em questão.

Enfim, o presente estudo objetiva estabelecer parâmetros comparativos de reparação entre *lasers* CO₂ com 2W e 4W de potência, diodo com 2W e 4W de

potência, bisturi elétrico 2W e bisturi convencional, observando os diferentes estágios da reparação tecidual através da imuno-histoquímica, para quantificar o índice de proliferação celular através do PCNA nos diversos cortes realizados em mucosa lingual de ratos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Descrição anatômica e histológica do tecido lingual

A língua é um órgão muscular, recoberto por mucosa. A mucosa, é uma estrutura que reveste as superfícies úmidas do tecido, sendo composta por tecido conjuntivo, tecido epitelial e tecido muscular. Esta mucosa pode ser dividida em três tipos: mucosa de revestimento, mastigatória e especializada. Nos humanos, o revestimento epitelial da cavidade oral, não está sujeito a grande atrito, e é denominado epitélio pavimentoso estratificado não-queratinizado nas regiões da superfície ventral da língua, no assoalho da boca e na superfície mucosa dos lábios e bochechas. Entretanto, torna-se queratinizado sobre as gengivas, o palato duro e, na maior parte da superfície dorsal da língua, onde necessitam maior proteção contra a abrasão durante a alimentação. Nos roedores, toda a mucosa jugal está exposta às forças de fricção e cisalhamento; possui, portanto, epitélio pavimentoso estratificado queratinizado. O epitélio oral prolifera-se constantemente, sendo originadas novas células na sua camada mais profunda e de outras camadas na sua superfície. Durante o deslocamento, as células sofrem modificações: acumulam filamentos intermediários, chamados de tonofilamentos e, no caso dos epitélios queratinizados, o citoplasma acaba repleto de filamentos de queratina. Essas células são chamadas de queratinócitos. A rápida proliferação e constante renovação da mucosa oral permitem o restabelecimento rápido da sua integridade, após lesões ou intervenções cirúrgicas.¹⁵

Abaixo da camada especializada do corpo da língua, está uma camada de tecido conjuntivo, a lâmina própria. Fibras de tecido conjuntivo da lâmina própria, estendem-se da mucosa em profundidade para o interior e entre os feixes musculares da língua. Esse tecido localizado abaixo do epitélio une essa mucosa aos músculos esqueléticos subjacentes. A superfície inferior da língua está voltada para diante e está em contato com o assoalho da boca, sendo recoberta por membrana mucosa simples, indiferenciada, que também adere intimamente à

musculatura lingual. A lâmina própria e o epitélio não queratinizado desta região são delgados, devido à sua localização protegida.¹⁶

Características mostradas na figura 2.1.

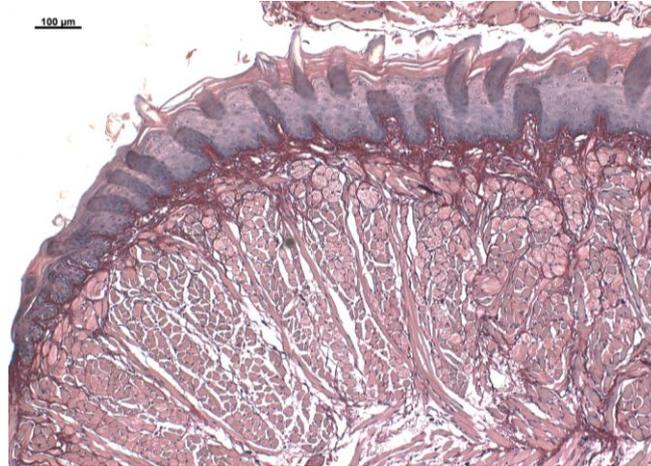


Fig. 2.1 – Imagem do corte da região dorsal da língua. Aumento original 25X coloração HE

2.2 O reparo 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 se inicia imediatamente após o dano para restabelecer a estrutura e a função do tecido lesado.^{17, 18, 19} Os elementos essenciais para que se iniciem estas atividades são: as células residentes (células endoteliais, queratinócitos, fibroblastos), os leucócitos (neutrófilos, monócitos/macrófagos, linfócitos), e os mediadores de natureza lipídica e proteica.^{20, 21}

O reparo tecidual pode ser dividido em três fases: inflamação, formação de tecido de granulação e deposição, e remodelação da matriz extracelular,²² embora alguns autores dividam esta reparação em quatro fases, sendo a primeira a hemostasia.^{23, 24} A reparação envolve dois processos: a regeneração, que se refere à substituição das células lesadas por células do mesmo tipo, e a cicatrização ou reparação que se caracteriza pela neoformação do tecido conjuntivo, com substituição das células lesadas e alteração da arquitetura tecidual. Os processos de inflamação e reparo reforçam a notável capacidade do corpo humano de restaurar a si mesmo.²²

O processo reparacional é extremamente complexo ocorrendo reações e interações interdependentes simultaneamente.^{19, 25} A primeira fase, a da inflamação, ressaltada como principal, é caracterizada por eventos vasculares e celulares, envolvendo a formação do coágulo, deposição de fibrina-fibronectina, inflamação, reepitelização, neovascularização, fibroplasia e contração. Tanto em feridas bucais quanto em feridas de pele, estão envolvidos vários tipos celulares: os mediadores solúveis que são os neutrófilos, macrófagos, fibroblastos, queratinócitos e células endoteliais; e os mediadores insolúveis que são os fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas (componentes da matriz extracelular).^{26, 27, 28} Dessa maneira, a cicatrização depende não só das células e polipeptídeos disponíveis, mas do microambiente da matriz extracelular (MEC).²⁹

Foi observado que os queratinócitos migram pela área basal para restabelecer a barreira epitelial.¹⁷ A matriz provisória de fibrina-fibronectina age como uma rede para adesão celular e migração. Esta matriz é substituída por tecido de granulação rico em fibronectina, que oferece uma rede vascularizada para subsequente deposição de colágeno. Nesta fase, os fibroblastos responsáveis pela produção de proteínas, como o colágeno, se entrelaçam fechando a ferida; ao mesmo tempo, ocorre uma angiogênese, por proliferação das células endoteliais, com formação de capilares e, assim, dar-se a organização da cicatrização.³⁰

Nas primeiras 24 a 36 horas após a lesão, fatores de crescimento epidérmicos estimulam a proliferação de células do epitélio. Na pele, os queratinócitos são capazes de sintetizar diversas citocinas que estimulam a cicatrização das feridas cutâneas. As células epiteliais migram sobre a área cruenta a partir das bordas da ferida e dos folículos pilosos próximos, induzindo a contração e a neoepitelização. Os queratinócitos, localizados na camada basal da epiderme residual ou na profundidade dérmica, migram para recobrir a ferida. As células epiteliais movem-se, aos saltos e desordenadamente, até as bordas, aproximando-as. A epitelização envolve uma sequência de alterações nos queratinócitos da ferida: separação, migração, proliferação, diferenciação e estratificação.³¹

Em termos clínicos, a regeneração pode ser classificada em primeira intenção (quando os bordos são deixados unidos), segunda intenção (quando não é possível unir os bordos, o próprio organismo preenche o espaço necessário à cicatrização) ou terceira intenção (está evoluindo por segunda intenção e sutura-se para ajudar na cicatrização).

Este processo depende de: fatores locais e sistêmicos do hospedeiro, fatores locais e externos do ambiente, tipo de fermento, tempo de evolução, órgão ou tecido envolvido e, das técnicas utilizadas; sendo, basicamente, o mesmo em todo organismo.¹⁸

2.3 CICLO CELULAR

O ciclo celular é uma série ordenada de eventos que culminam na duplicação da célula. Nos mamíferos, tem duração média de 18 a 24 horas, que é basicamente controlada pela duplicação do DNA e pela mitose. O ciclo se divide em quatro fases principais: G1, S, G2 e M. A fase G1 é o período compreendido entre a divisão celular e o início da síntese de DNA (fase S), período em que a célula cresce e toma forma. Durante a fase S (síntese) ocorre a duplicação dos cromossomos (replicação do DNA). Depois de passarem pela fase G2, onde é feita uma checagem do DNA até que se encontre pronta para a divisão celular, tem início o complicado processo da mitose, fase M. Nesta fase, os cromossomos são separados e a célula divide-se em duas células filhas cromossomicamente idênticas. É na prófase, primeiro estágio da fase M, que as cromátides se condensam. Cada cromossomo replicado contém duas cromátides com a mesma informação genética. As cromátides-irmãs, produzidas pela duplicação do DNA durante a fase S, permanecem ligadas pelo centrômero e se alinham no centro da célula durante a metáfase. Na anáfase as cromátides-irmãs separam-se e migram para pólos opostos puxadas pelo aparelho mitótico. Na maioria das células dos eucariotos superiores, o envelope nuclear rompe-se em muitas vesículas no início da mitose, e se recompõe em torno dos cromossomos segregados quando eles se descondensam durante a telófase, o último estágio da mitose.³¹

O ciclo celular pára em diversos pontos de controle e, só prossegue, se certas condições existirem, por exemplo, se a célula atingir um determinado diâmetro. Algumas células, como os neurônios, nunca se dividem, uma vez que ficam bloqueadas na fase G0.²⁹

2.4 A IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA PCNA

A Imuno-histoquímica (IHQ) combina Anatomia Patológica, Imunologia e Bioquímica. Baseia-se na conjugação de distintos marcadores, com moléculas de imunoglobulina, que com auxílio de um substrato específico localiza o antígeno tecidual. A marcação IHQ é a detecção de antígenos em cortes de tecidos pelo uso de anticorpos, de modo que a ligação entre antígeno e anticorpo seja microscopicamente visível por meio de coloração. É utilizada para o estudo de doenças neoplásicas e infecciosas para o diagnóstico e entendimento da histogênese, etiologia e patogênese do tecido. A detecção da proteína PCNA (marcador nuclear de proliferação celular) pela técnica de imuno-histoquímica é de grande valia na análise de células em fase proliferativa.³²

O PCNA é uma proteína nuclear sintetizada durante o ciclo celular. Possui importante papel na síntese e no reparo do DNA, sendo utilizado como marcador da proliferação celular, detectado desde a fase G1 até a transição G2 a M, atingindo seu máximo na fase S do ciclo celular.³³

Foi observado que esta proteína está ausente na fase G0. Sua expressão varia muito nas fases G1, S, G2 e M e pode ser induzida por dano ao DNA e, ainda, possui meia-vida longa, fazendo com que as frações proliferativas sejam, muitas vezes, super-representadas.^{33, 34,}

O PCNA, também chamado ciclina, é uma proteína (36 kD de DNA polimerase delta). Está presente nas fases G1, S e G2 do ciclo celular e o gen que o codifica tem sido clonado em diversas espécies, inclusive, havendo semelhança com o PCNA humano. O padrão de positividade é nuclear, podendo ocorrer diferenças na intensidade de marcação em decorrência da expressão distinta nas diferentes fases do ciclo celular, sendo, portanto, observada maior positividade nuclear para as células que se encontram na fase S do ciclo celular.^{35, 36}

O LASER

A utilização dos *lasers* de alta potência nas cirurgias orofaciais é cada vez maior, e por isso, tem sido motivo crescente no processo de investigação, incluindo a necessidade de se estudar histologicamente o impacto dessa energia e suas consequências na reparação tecidual.

A literatura relata que o primeiro procedimento cirúrgico com *laser* foi descrito somente em 1977, numa cirurgia para abrir uma janela naso-antral por meio de um *laser* de Argônio.³⁷

Quanto aos procedimentos orais, foi demonstrado clinicamente que a terapia a *laser* apresenta vantagens quando comparada à cirurgia convencional: são procedimentos cirúrgicos com o mínimo de sangramento, campo relativamente seco, o que melhora a visibilidade, esterilização da área cirúrgica pela vaporização dos microrganismos e decorrente redução da bacteremia, maior rapidez na maioria dos procedimentos, diminuição do trauma ao tecido adjacente, redução da dor e inflamação pós-cirúrgica com conseqüente redução no tempo da cicatrização, redução da formação de cicatriz, e a aceitação dessa modalidade de tratamento pela maioria dos pacientes. Conclui-se que o *laser* é uma importante ferramenta nos processos envolvendo incisões, excisões e coagulação de lesões da mucosa oral.^{38, 39, 40}

A quantidade de destruição tecidual e a profundidade de penetração do *laser*, variam de acordo com o tamanho do feixe, densidade de potência e/ou energia e a duração da exposição do tecido ao *laser*.⁴¹

Vários autores têm demonstrado a superioridade da irradiação com lasers de alta potência em relação às técnicas convencionais. Porém, os efeitos térmicos e a área do dano tecidual são reações adversas de grande importância, pois, podem interferir diretamente no processo de cicatrização.^{42, 40}

Por este motivo, a comparação dos efeitos térmicos do *laser* com técnicas convencionais (bisturi convencional e bisturi elétrico) tem sido motivo de diversas publicações.⁴³ Obviamente, o bisturi convencional não causa necrose por dano térmico, porém, falha em promover a hemostasia, redução bacteriana, vantagens estas proporcionadas pelo uso do laser. Alguns autores relatam que o dano térmico é de 3 a 5 vezes maior após o uso de bisturi elétrico quando comparado à utilização do *laser* de CO₂.⁴⁴

Em 1992, alguns pesquisadores referiam-se ao cepticismo de muitos cirurgiões, acerca do uso da tecnologia a *laser*. Entre os fatores que influenciam a decisão de não utilizar o *laser*, os profissionais citam a diferença na sensação tátil, a falta de desenhos ergonômicos para muitos dos *lasers* cirúrgicos, e dúvidas na seleção da dose correta para a realização de incisões com a profundidade requerida pelo caso, e que provoque uma hemostasia efetiva sem causar dano térmico excessivo. Segundo estes profissionais, deve-se realizar esforços para incrementar a utilização dessa tecnologia nas instituições de ensino, elevando dessa forma, seu nível de aceitação como instrumento de uso frequente. ⁴⁵

Estudos histológicos com base na evidenciação clínica, têm permitido avaliar mais detalhadamente as propriedades da interação luz/tecido, a fim de responder com mais clareza aos questionamentos de alguns profissionais ainda receosos sobre o assunto.

Através da observação da morfologia celular, efeitos na membrana, atividade celular e índice de proliferação, pode-se avaliar o dano celular. ⁴⁶

LASER DE CO₂

O *laser* CO₂ foi desenvolvido por *Patel* e seus colaboradores em 1964; sua emissão encontra-se na região do infravermelho do espectro eletromagnético, com comprimento de onda de 10.600nm, e seu uso, em cirurgias de tecido mole, foi aprovado pelo F.D.A. (*Food and Drug Administration*) em 1976. Este *laser* incide sobre o tecido de uma maneira precisa, e com mínimo sangramento, podendo ser utilizado na completa remoção da mucosa gengival, deixando o tecido conjuntivo intacto e viável.^{47, 48, 49, 50}

A energia do *laser* de CO₂ vaporiza o fluido intra e extracelular causando a desintegração da estrutura celular. Os pequenos vasos sanguíneos são selados espontaneamente, permitindo ao cirurgião uma excelente visibilidade e precisão durante o ato cirúrgico. O feixe do *laser* causa uma destruição localizada, e o tecido ao redor da área de impacto sofre pequenas alterações. A ferida é geralmente coberta por tecido carbonizado e, após 24 horas, por um coágulo fibrinoso.^{51, 52, 53, 54}

A aplicação do *laser* de CO₂ sobre os tecidos moles, desencadeia um fenômeno histopatológico básico exibido pelo tecido que varia de necrose do tipo coagulação até o desaparecimento, em diversas profundidades, da estrutura tecidual. Os autores concluíram que o grau da lesão é diretamente proporcional ao aumento da potência e ao tempo de exposição.⁵⁵ A reação inflamatória aguda é mínima e, durante a cicatrização, alguns miofibroblastos e fibras colágenas estão presentes.⁴⁹

Comparando histologicamente os processos de cicatrização das feridas realizadas com o *laser* de CO₂ e bisturi convencional na mucosa bucal de ratos, observou-se que nas realizadas com *laser*, houve formação de uma cratera com partículas de tecido carbonizado e necrosado. Porém, a 1 mm de profundidade, o tecido mostrava normalidade, embora com grande quantidade de células inflamatórias. A cicatrização foi ligeiramente retardada. A injúria provocada no tecido ao redor da área irradiada foi reduzida. Nas feridas realizadas com bisturi convencional, houve inflamação crônica suave, não houve necrose e a completa cicatrização ocorreu aos 11 dias. Os autores concluíram que houve uma acentuada diferença entre os dois tipos de incisões. A resposta inflamatória foi mais severa e o processo de reparo mais lento nas incisões realizadas com *laser*.⁵²

As mudanças histológicas ocorridas após cirurgias realizadas com *laser de CO₂* na remoção de discos da mucosa oral em cães *beagle*, foi registrado menor formação de colágeno, regeneração epitelial demorada e mais irregular, em relação ao padrão de cicatrização.⁵⁶

Estudo realizado em 1987 comparou as distribuições e a quantidade dos componentes da matriz extracelular, laminina, colágeno tipo IV, tipo III e fibronectina após feridas realizadas por *laser de CO₂* e bisturi convencional. Nos cortes avaliados após 2 dias, foi observada uma reepitelização inicial evidente na cicatrização das feridas feitas a *laser*; a reepitelização foi concluída por volta do 11º dia após a cirurgia. O estudo sugeriu que a quantidade de miofibroblastos presentes nas feridas a *laser*, foi pequena quando comparada às feridas com bisturi convencional. Os elementos da cicatrização nos dois tipos de feridas foram semelhantes, sendo que, nos locais tratados a *laser*, houve uma ocorrência ligeiramente mais lenta. Os autores sugerem que a lesão causada pelo aquecimento é, provavelmente, uma das razões da velocidade de cicatrização mais reduzida e de reação inflamatória mais evidente.⁴⁷

Para estudar os miofibroblatos, foram realizadas biópsias cutaneomucosas com *laser de CO₂* e com bisturi convencional. Os espécimes foram removidos em tempos variáveis: 2 horas, 24 horas e 4 dias. No 4º dia, observaram que persistia uma hiperatividade fibroblástica nas incisões com bisturi convencional, somada a uma edificação micro fibrilar colágena abundante, como também, numerosos miofibroblastos durante a cicatrização, enquanto que estes, eram ausentes no grupo com *laser*.⁵⁷ Depois de analisar a expressão de miofibroblastos na cicatrização de excisões feitas a *laser de CO₂* e com bisturi convencional, os autores concluíram que estas, levaram mais tempo para aparecer e desaparecer nas feridas feitas com *laser de CO₂*, como também, estavam em menor quantidade em relação às excisões feitas com o bisturi convencional.¹²

Num estudo histológico do nervo facial lesado em ratos, visto que, uma das condições mais importantes para a regeneração da função do nervo facial, é uma adequada cooptação da bainha de mielina nas extremidades lesadas do nervo, os autores chegaram à seguinte conclusão: a utilização do *laser de CO₂* resultou numa melhor orientação da regeneração nervosa, e a carbonização produzida pelo *laser de CO₂* não influenciou negativamente na cronologia do processo de reparo, quando analisado a longo prazo.⁵⁸

Em outro experimento em feridas produzidas pelo *laser* de CO₂ na mucosa vestibular de cães, foi observado um atraso na reepitelização da região, porém, a reação inflamatória foi reduzida quando comparada com o bisturi convencional.¹⁰

Foi concluído que a reação inflamatória em feridas realizadas com o bisturi convencional e com o *laser* de CO₂ mostraram uma reação de grau de moderado a severo. Houve proliferação de vasos sanguíneos nos dois tipos de feridas, no período de dois dias. No *laser* de CO₂ o infiltrado inflamatório aparece mais devagar, porém com maior proeminência no processo de reparo das feridas.⁴⁷

Em 1987, foi comprovada a eficácia do *laser* de CO₂ para cirurgias de hiperplasias gengivais e freios com inserção anômala. Em 0,5 segundos o tecido epitelial apresentava-se completamente removido e o tecido conjuntivo com pouco ou nenhum dano a 1 mm de profundidade abaixo do epitélio.^{48, 59, 60}

Foi observado um resultado com um mínimo sangramento durante a incisão, pouco desconforto no pós-operatório dos pacientes e após 3 semanas os tecidos já estavam totalmente cicatrizados.⁶¹

Ainda em 1987, pesquisadores avaliaram o efeito do *laser* de CO₂ sobre cortes em língua de ovelhas obtendo os espécimes em períodos de uma hora, 1, 2, 4, 7, 14, 21 e 28 dias. Histologicamente, os resultados da primeira hora mostrava carbonização das bordas, total remoção do epitélio, formação de uma úlcera (delimitada por uma suave camada de tecido coagulado) e, em algumas áreas, remoção de tecido conjuntivo e das fibras musculares e vasos sanguíneos superficiais coagulados. Um dia após o procedimento houve reação inflamatória aguda. O novo epitélio cobriu totalmente a superfície da ferida, aos 14 dias. Células inflamatórias crônicas estiveram presentes ainda aos 28 dias. Os autores concluíram que o *laser* de CO₂ tem poder de corte e coagulação favorável no tratamento de lesões da mucosa bucal.⁶²

Num estudo histológico em biópsias feitas no 2°, 5°, 10°, 20° e 40° dias pós-cirúrgicos para avaliar o processo de reparação das feridas em incisões feitas com bisturi convencional, bisturi elétrico e *laser* de CO₂, foi observado que a cicatrização desenvolvida foi melhor nas áreas onde o *laser* foi aplicado e pior nas do bisturi elétrico.⁵⁰

Quanto à cicatrização de incisões realizadas na mucosa palatina de ratos com o *laser* de CO₂, observou-se uma cavidade pouco profunda, vazia, cujas bordas mostravam tecido conjuntivo fibroso com sinais de necrose do tipo coagulativo. O

epitélio de revestimento nos extremos da cavidade mostrou-se desorganizado e também com áreas de necrose. Aos sete dias o tecido cicatricial já se encontrava bem organizado.^{53, 63}

Comparando as alterações microscópicas provocadas pelo *laser* de CO₂, nas estruturas pancreáticas de cães, constatou-se que uma superfície irregular de material necrótico carbonizado com sulcos e forames e camadas de células rotas com citoplasma coagulado. O bisturi convencional produziu uma superfície regular com apenas algumas células rotas. Os autores concluíram que o *laser* de CO₂ provocou necrose e uma reação tecidual mais intensa.⁵⁴

No processo de cicatrização de incisões realizadas no abdômen de ratos com o *laser* de CO₂, bisturi elétrico e bisturi convencional, no período de 12 horas, houve relativa ausência da resposta inflamatória ao redor das feridas por *laser* e mínima destruição celular na área de atuação do feixe. As feridas realizadas com o bisturi elétrico apresentaram suave extravasamento de hemácias e uma reação inflamatória mais intensa. O bisturi convencional provocou, inicialmente, destruição celular com relativa ausência da resposta inflamatória. A epitelização das incisões realizadas com *laser* e com bisturi convencional ocorreu num período de sete dias, porém, ainda havia permanência de suave exsudato inflamatório. As incisões realizadas com bisturi elétrico não foram completamente epitelizadas aos sete dias, exibindo ainda um severo exsudato inflamatório crônico. Os autores concluíram que, nas condições de realização do estudo, o *laser* de CO₂ removeu tecido de maneira satisfatória, permitindo um reparo rápido, previsível, com mínima resposta inflamatória.⁵⁰

Em 1996, profissionais realizaram feridas cirúrgicas com o *laser* de CO₂ na língua de ratos, com a finalidade de avaliar o processo de reparo em incisões na região anterior da superfície dorsal da língua. Os animais foram mortos imediatamente, 2, 4, 6, 8, 10 e 30 dias após a irradiação. A análise histológica mostrou vaporização instantânea do fluido intra e extracelular, desintegração das células, denaturação das proteínas extra celulares e oclusão dos capilares. No décimo dia, houve completa reepitelização das feridas.⁶⁴

Na análise histológica de tecido gengival irradiado com o *laser* de CO₂, foi observada a total carbonização do epitélio e áreas de necrose por coagulação. O tecido conjuntivo subjacente exibiu três zonas: a zona de necrose tissular com colágeno coagulado e quase nenhuma célula presente; a zona de efeito térmico

exibindo pequenas artérias, arteríolas e veias obliteradas por coágulos, assim como inflamação moderada e fibras colágenas com aparência vidrosa, e a zona de tecido conjuntivo normal.⁶⁵ Os autores concluíram que o *laser* de CO₂ pode eliminar o epitélio, deixando o tecido conjuntivo basicamente inalterado. Concluíram que o *laser* de CO₂ é um método alternativo para o tratamento de lesões bucais do tecido mole e alcança resultados melhores que cirurgias convencionais graças à hemostasia, conseguindo uma melhor visualização do campo operatório, esterilização da área cirúrgica, mínima dor pós-operatória e reparação sem contração nem cicatriz.⁶⁶

Gengivectomia realizada com *laser* de CO₂ em portadores de hiperplasia gengival, o autor relatou que o procedimento foi rápido, com mínimo de sangramento e desconforto para o paciente, a cicatrização ocorreu entre duas e três semanas, sem efeitos indesejáveis tanto no tecido gengival quanto no dentário.⁶⁷

Segundo alguns autores, os efeitos do *laser* de CO₂ em tecidos compostos por 70% a 90% de água atingem uma profundidade de 0,17 mm.^{6, 7, 9, 58, 68}

Foi realizado estudo para avaliar a qualidade do reparo da mucosa bucal de ratos submetida à radiação do *laser* de CO₂, com a finalidade de estabelecer parâmetros que permitam cirurgias com um mínimo de dano tecidual. As irradiações foram realizadas na mucosa da região jugal direita com potências de 2 W, 7 W e 10 W, emissão pulsada, pulsos de 0,5 segundos. Segundo os resultados do estudo, os animais irradiados com 2W de potência não apresentaram atraso significativo na cronologia de reparo, mostrando-se esta potência adequada para uso em mucosa. Os animais irradiados com 7 W e 10 W apresentaram comprometimento e atraso na cronologia de reparo, quando comparados aos do grupo de 2 W.⁶⁹

Num estudo realizado, de cirurgia a laser CO₂, no período de 1976 a 2001, em 282 pacientes com leucoplasia oral, foi observado que a cura das feridas aconteceu por epitelização, das bordas para o centro. Na maioria dos casos a cicatrização estava completa em 4 semanas. Depois de cicatrizado não se percebia diferença na aparência ou na elasticidade própria da mucosa na área tratada comparada à normal. Segundo os autores, o tratamento com laser apresenta certas vantagens para remoção seletiva do epitélio afetado e mínimo prejuízo para os tecidos vizinhos saudáveis, resultando em um excelente processo de reparo com mínima ou nenhuma cicatriz, além de um bom resultado funcional. Relataram como desvantagem mais importante, o fato da evaporação causada pelo *laser* CO₂

inviabilizar a análise histológica do espécime patológico. Concluíram que, quando usado corretamente e por profissionais experientes, o *laser* cirúrgico (CO₂) pode ser um excelente tratamento para a leucoplasia.⁷⁰

Em indivíduos portadores de hemangiomas intra-orais os autores realizaram um estudo onde o *laser* de CO₂ mostrou-se excelente para estas excisões e vantajoso em relação a todos os outros tipos de *laser* e ao bisturi convencional, devido ao efeito coagulante e à excisão *in totum*. Em todos os casos tratados alcançou-se máxima proteção do tecido, livre de infecção, sem complicação nem sangramento.⁷¹

Em 2005, pesquisadores compararam a recuperação morfológica e funcional após glossectomia parcial, com *laser* de CO₂ e sugeriram que a disfunção pós-cirúrgica foi reduzida quando as bordas da excisão foram deixadas sem sutura após a glossectomia parcial com *laser* de CO₂. Microscopicamente, o tecido cicatricial no grupo *laser* foi menor em extensão que no grupo controle.⁷² Sem a preocupação com a função do órgão, comparando a eficiência da cicatrização de feridas feitas em pele de rato, entre o fechamento da incisão com bisturi convencional com sutura e com vaporização pelo *laser* de CO₂, detectou-se que, depois de 21 dias, as duas incisões apresentaram as mesmas características clínicas.⁷³

Em 1999, numa avaliação da cicatrização de incisões realizadas no palato de macacos, utilizando um bisturi convencional e o *laser* de CO₂ utilizando potências de 2 W, 4 W e 6 W em emissão contínua, foco a 0,5 cm de distância do tecido e tempo de irradiação de 6 segundos, os autores observaram que aos 3 dias, a superfície epitelial foi substituída por um exsudato fibrinopurulento. No tecido conjuntivo, houve fragmentação e desorientação das fibras colágenas, infiltrado de células inflamatórias presentes tanto na inflamação aguda como na crônica. Aos 7 dias, a ferida apresentava-se completamente epitelizada, e no tecido conjuntivo houve pequenas quantidades de fibrilas colágenas novas entre as fibras já existentes e um suave infiltrado de células inflamatórias mononucleares. As feridas realizadas com o bisturi convencional foram completamente epitelizadas no período de 3 dias, com evidências de atividade fibroblástica e um suave infiltrado de células mononucleares. Aos 14 dias houve completa regeneração do epitélio e do tecido conjuntivo nos dois tipos de incisões. Segundo os resultados do estudo, o *laser* de CO₂ ocasionou maiores mudanças no tecido e uma intensa reação inflamatória retardando o reparo no estágio inicial.⁷⁴

Estudos envolvendo o *laser* CO₂ analisaram a expressão dos miofibroblastos, células responsáveis pela contração da ferida, na cicatrização. Os ratos foram eutanados imediatamente, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 14, 17, 22, 26 e 30 dias após a cirurgia, sendo seis do grupo *laser*, três do bisturi convencional e um do controle. A análise histológica foi feita por meio de estudo imuno-histoquímico, corado com H&E (hematoxilina eosina). A quantidade máxima de miofibroblastos foi três vezes maior nas incisões com bisturi, comparando-as com as do *laser* CO₂. O valor de pico foi atingido aos 3 dias com o bisturi convencional e aos 4 dias com o *laser*.¹²

Laser de diodo

O *laser* de diodo tem emissão no espectro eletromagnético infravermelho próximo, com comprimentos de onda que vão desde 805 a 980nm, podendo haver emissão no modo pulsado ou contínuo, e na forma de contato ou não, dependendo da sua indicação clínica. A energia elétrica gerada é transformada no feixe da luz *laser*. Esses *lasers* são pouco absorvidos pelos tecidos duros, não havendo dano térmico nos mesmos, desde que energias adequadas sejam utilizadas. Portanto, podem ser utilizados em cirurgias de tecido mole próximo ao esmalte, dentina e cimento dentários, desde que se utilizem parâmetros seguros.^{75, 76, 77}

Recentemente, incisões realizadas com *laser* de diodo 970nm foram comparadas a incisões com bisturi elétrico. Os autores verificaram que os animais incisionados com *laser* apresentavam dano tecidual mais exacerbado que incisões realizadas com bisturi elétrico.⁷⁵

Numa outra experiência clínica obtida utilizando o *laser* de diodo de alta intensidade (Ga-Al-As, 980nm) em frenectomias, remoção de hiperplasias gengivais e peri implantares, os autores concluíram que o *laser* de diodo pode ser utilizado em procedimentos cirúrgicos com efeitos benéficos apresentando uma cicatrização sem complicações, edema, sangramento, dor ou formação de cicatriz.⁷⁶

Dentre o grande número de desenvolvimentos recentes na tecnologia *laser*, um dos mais promissores para a aplicação direta é o *laser* de diodo de alta potência. É altamente eficiente, compacto e de baixa manutenção, com elevado potencial em aplicações cirúrgicas. Os procedimentos médicos que envolvem tecidos moles são os que mais se beneficiam da utilização deste *laser*. De acordo com os autores, estes conseguem substituir os *lasers* de Nd:YAG e CO₂. Além do fato de possuir um sistema de entrega do feixe *laser*, através de uma delicada fibra de aproximadamente 1mm de diâmetro, possibilitando ao operador melhor capacidade de focalização, uma maior flexibilidade durante a operação e facilidade de manuseio, pontuando mais algumas vantagens além das citadas anteriormente.

Pesquisadores realizaram um estudo no qual compararam os diversos aparelhos *laser* utilizados nos procedimentos clínicos estéticos, em recontorno tecidual conservador de uma frenectomia com *laser* de diodo, o resultado apresentou excelente capacidade de cortar com precisão, controlar a hemostasia e a baixa absorção pela estrutura dentária, permitindo, um corte seguro mesmo próximo

ao dente. Após 6 dias, observaram uma cicatrização excelente, além da ausência desconforto do paciente.⁷⁷

Diversos procedimentos relativos à área do uso clínico do *laser* de diodo de alta potência na ortodontia, podem beneficiar-se com o uso desta técnica, tais como: recontorno e escultura gengival; frenectomia, gengivectomia de excesso de tecido hipertrófico e de opérculo gengival. A ablação de tecido mole com *laser* de diodo é considerado um procedimento simples com excepcionais resultados estéticos.⁸⁰

O tratamento com *laser* de diodo cirúrgico na doença periodontal resultou na diminuição da inflamação e subsequente redução da profundidade da bolsa periodontal. Concluíram que o laser cirúrgico odontológico, além de poder ser usado na remoção das patologias orais de tecido mole, também possui um excelente benefício no tratamento das doenças periodontais⁶

Outros autores relatam também eficácia clínica do *laser* diodo associado ao tratamento periodontal convencional: observaram que grupo controle teve uma redução de 19,55% menor no sangramento a sondagem do que o Grupo *laser*.⁷ Em 2004, utilizaram o *laser* diodo (980 nm) para remoção do epitélio de bolsas periodontais em porcos. A avaliação histológica demonstrou que a instrumentação radicular associada ao *laser* de diodo permitiu a completa remoção epitelial em comparação ao tratamento convencional, independente da experiência dos indivíduos.⁷⁴

Foi realizado estudo para comparar o processo de reparação tecidual das incisões em pele e língua de ratos com o *laser* CO₂, *laser* de diodo, bisturi elétrico e bisturi convencional, para avaliar o número de mastócitos. Os animais foram eutanados imediatamente, 24, 48, 72 horas, 7 dias e 14 dias do pós-operatório. Após 14 dias uma contagem, desse tipo celular, significativamente maior foi observada na reparação das incisões com bisturi convencional em relação ao *laser* CO₂ (2 e 4 W); das incisões do *laser* de diodo (2 W) em relação ao *laser* CO₂ (2 W e 4 W) e do bisturi elétrico em relação aos *laser* CO₂ (2 e 4 W) e de diodo (2 e 4 W). A quantificação de colágeno nos processos reparacionais verificada imediatamente após as incisões e nos intervalos de 24, 48 e 72 horas, revelou que não houve diferença estatisticamente significativa. Após 7 dias a contagem observada na incisão com bisturi convencional foi maior em relação às incisões com *laser* CO₂ (2 W) e bisturi elétrico e menor em relação às do *laser* de diodo (4 W). Após 14 dias também não houve diferença entre todas as técnicas.⁸¹ Neste estudo, a autora,

observou que o mecanismo da reparação tende a ser semelhante em incisões padronizadas, independente da técnica utilizada; no entanto, variações reparacionais, com técnicas semelhantes, poderiam estar associadas às características do tecido.⁸¹

Considerando o uso de bisturi elétrico na incisão e coagulação do tecido mole, foram observadas algumas vantagens quando comparado com o bisturi convencional. Entre as vantagens citadas destacam-se a diminuição do tempo de cirurgia, o esgotamento da perda de sangue, e uma melhor visibilidade do campo cirúrgico.^{13, 14}

3 OBJETIVO

Esse estudo tem como objetivo avaliar e comparar a reparação epitelial após incisão com o *laser* de CO₂, *laser* de diodo, bisturi elétrico e bisturi convencional em mucosa oral de ratos, utilizando imuno-histoquímica para avaliação do coeficiente de proliferação celular em mucosa oral de ratos nos seguintes tempos de reparação: 1h, 24h, 48h, 72h, 7 dias e 14 dias após a incisão.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Material - Marca

Balança de precisão - Soehnle

Cuba de vidro

Gaze Derma-plus

Luvas de procedimento - Derma-plus

Tábua de cortiça

Formol 10% (vol.)

Álcool 70% (vol.)

Algodão hidrófilo

Gaiola (com serragem e água)

Solução anestésica de ketamina/xilasina (2:1), contendo 0,1ml/100g de animal, (Rompum[®]/Francotar[®]) Bayer

Lâmina de bisturi número 12 Two Arrows

Cabo de bisturi curvo Duflex

Serings 5ml e agulha 30/7

Régua milimetrada

Ração labina Purina

Laser de diodo Vision

Laser de CO₂ Optronika

Pinças denteadas - Duflex

Hidrato de cloral

Recortador do plástico da fibra Vision

Caneta para calibrar a fibra Vision

Óculos de proteção do *laser* de diodo Vision

Óculos de proteção do *laser* de CO₂ Optronika

Caneta permanente Pilot

Câmera fotográfica acoplada à lente medical (120mm) Nikon D-70

Microscópio óptico de luz branca Nikon – YS100

Microscópio óptico de luz branca Nikon Eclipse 1200F E600 DXM

Câmera digital Nikon DXM – 1200F

4.1 MATERIAL

4.1.1 Animais

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

4.1.2 INSTRUMENTOS UTILIZADOS

- Laser de CO₂, marca comercial Union Medical Engineering Coo UM-L30 (Seul, Coréia do Sul), comprimento de onda de 10600 nm.
- Power meter (Coherent Radiation – Palo Alto, EUA), Reader (modelo 201, série 2134), Sensor (modelo 101).
- Laser diodo, arseneto de gálio-alumínio, marca comercial Diodo Lasering L808 (Milão, Itália), comprimento de onda de 808 nm Power meter (Molelectron detector incorporated, modelo PM 600, Portland, EUA)
- Bisturi elétrico, marca comercial Microem - MOD Bi800 (Porto Alegre, RS)
- Lâminas de bisturi convencional n^o 15 (Wiltex®, São Paulo)
- Papel carbono, marca comercial Detecto®, Niterói, RJ, para foto ativação da fibra óptica do laser de diodo.

4.2 MÉTODO

4.2.1 Método experimental

Os animais foram aleatoriamente distribuídos em 6 grupos experimentais, cada grupo contendo 5 animais. Todo processo experimental foi desenvolvido em um único dia. Os ratos foram anestesiados individualmente com indução anestésica por via parenteral na região abdominal, realizada com Ketamina (25 mg/kg, Holiday®) e Xylazina® (10 mg/Kg, Rompun®, Bayer). Cada animal foi submetido seis incisões na língua. As incisões foram manuais, com medidas aproximadas de 2,5 mm de comprimento por 1mm de profundidade (na língua). As medidas das incisões foram monitoradas com auxílio de régua milimetrada (extensão) e de sonda periodontal milimetrada (profundidade).

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

Figura 4.1. (língua) – Aspecto macroscópico das incisões lineares. As superiores referem-se ao corte com *laser* de CO₂ (a esquerda 2W e a direita 4W), incisões ao centro realizadas com *laser* de iodo (a esquerda 2W e a direita 4W), incisões inferiores realizadas com bisturi elétrico a esquerda e bisturi convencional a direita



Após as intervenções, os animais foram mantidos em gaiolas individuais e posteriormente eutanados em câmara de CO₂, de acordo com os seguintes intervalos de tempo:

animais do Grupo 0, imediatamente após as intervenções;

Grupo 1, após 24 horas;

Grupo 2, após 48 horas,

Grupo 3, após 72 horas,

Grupo 7, após 7 dias,

Grupo 14, após 14 dias.

Após o sacrifício, seguindo os tempos indicados, as áreas incisadas foram cirurgicamente removidas e fixadas em formalina a 10%, e, em seguida enviada ao laboratório, onde as amostras foram processadas, desidratadas e incluídas em blocos parafina.

4.3 IMUNO-HISTOQUÍMICA E QUANTIFICAÇÃO DE PCNA

É O exame Imuno-histoquímico um método de diagnóstico complementar, que tem como objetivo a detecção de um determinado antígeno em um corte histológico. A técnica tem permitido a identificação de diferentes tipos de marcadores (enzimas, receptores e produtos de genes), que estão relacionados ao comportamento biológico celular. Principais indicações: avaliação prognóstica, diagnóstico histogenético, discriminação da natureza benigna e maligna de determinadas células, caracterização da origem de carcinomas e identificação dos agentes infecciosos. Para as reações de imuno-histoquímica, foi utilizado o seguinte anticorpo primário: o PCNA, antígeno nuclear de proliferação celular.

4.3.1 TÉCNICA DE IMUNOISTOQUÍMICA

As reações imuno-histoquímicas foram realizadas no Laboratório de Imuno-histoquímica da Disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo. Os cortes foram obtidos dos espécimes emblocados em parafina e estendidos em lâminas de vidro previamente tratadas com solução de 3 – aminopropiltriétoxissilano (Sigma, St. Louis, MO, USA) 10% em etanol absoluto. Estes cortes foram desparafinados em 2 banhos de xilol, sendo que o primeiro foi por 30 minutos em estufa à temperatura de 60° C e o outro por 20 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, procedeu-se à reidratação dos cortes em séries de etanol com concentrações descendentes (3 vezes em etanol absoluto, 95%, 85%) em banhos de 5 minutos cada. Para remoção do pigmento formólico foi realizado um banho de 10 minutos em hidróxido de amônio 10%, em etanol 95%, seguido de lavagem em água corrente por 10 minutos e 2 banhos de água destilada. Foi realizado o pré-tratamento para recuperação antigênica seguido de lavagem em água corrente por 10 minutos e 2 banhos de água destilada. Os cortes foram submetidos ao bloqueio da peroxidase endógena tecidual com solução de peróxido de hidrogênio 6% e metanol na proporção 1:1 em 2 banhos de 15 minutos cada. Posteriormente, foram realizadas lavagem em água corrente por 10 minutos, 2 banhos de água destilada e 2 banhos de 5 minutos cada em solução tampão de TRIS-HCL (hidroximetil-amino-metano) 0,5 M, pH7,4. As lâminas foram colocadas no

equipamento Dako Autostainer Universal Staining System (Dako Corp., Carpenteria, CA, USA) onde se realizaram as seguintes etapas: incubação dos anticorpos primários, incubação do anticorpo secundário polivalente (anticabra, coelho e camundongo) por 30 minutos, incubação do complexo terciário estreptavidina-biotina (kit LSAB Peroxidase K0609 – Dako Corp., Carpenteria, CA, USA) por 30 minutos, revelação da reação com iaminobenzidina (Dako Liquid DAB Plus K3468 – Dako Corp., Carpenteria, CA, USA) por 10 minutos e contra coloração com hematoxilina de Mayer por 10 minutos.

4.3.2 QUANTIFICAÇÃO DE PCNA

A expressão de antígenos nucleares de células endoteliais em proliferação será avaliada na neoderme.

A porcentagem de células epiteliais com antígeno positivo de proliferação celular será calculada contando células da margem da ferida até a extremidade da neoderme.

A localização dos campos e a quantificação das células marcadas pela expressão do PCNA foram realizadas em um microscópio binocular, num aumento de 100 vezes. A contagem se deu em três campos do epitélio, uma em cada extremidade e outra no centro, evitando cortes transversais das papilas. A avaliação quantitativa da expressão do PCNA foi feita nas camadas basal e intermediária do epitélio de cada campo selecionado, contando todas as células positivas e negativas. Foram consideradas células da camada basal aquelas que estavam em contato com o tecido conjuntivo subjacente e que apresentassem núcleo colunar.

Para a quantificação dos núcleos marcados com PCNA foi utilizado um microscópio binocular da marca Zeiss-Standard 20, com aumento de 100 vezes, ligado a um programa de computador (IMAGELAB – Sistema de processamento e Análise de Imagem / Softium Sistemas de Informática – São Paulo) que transfere as características do campo microscópico selecionado, através de uma câmera de vídeo, ligada à placa de captura de imagem do computador. Neste programa foi usado o recurso que permite a contagem manual, realizada através do apontamento pela seta do “Mouse” das estruturas a serem contadas na imagem exibida no monitor.

A quantificação foi feita em dois momentos distintos, pela mesma pessoa sem saber a que grupo pertencia a lâmina que estava sendo contada, caracterizando a imparcialidade do estudo.

4.4 Análise quantitativa

Foi realizada quantificação dos queratinócitos PCNA-positivos no epitélio de ambas as bordas da ferida. Para tanto, inicialmente foi calculada a área do epitélio utilizando-se software de morfometria digital (ImageLab2000®, São Paulo, Brasil) em um campo (aumento original de 100X) de cada borda da ferida, totalizando-se dois campos para cada espécime. Para cada campo analisado, no mesmo epitélio cuja área fora calculada, quantificou-se o número de queratinócitos positivos para PCNA. Em seguida, para cada espécime, foi obtido o número total de células e a área total epitelial somando-se os dados dos dois campos. Por fim, foi calculada a densidade de células, dividindo-se a área epitelial pelo número de células contadas. Todo o procedimento foi realizado por um único examinador. Como mostra na figura 4.4.1 e 4.4.2.

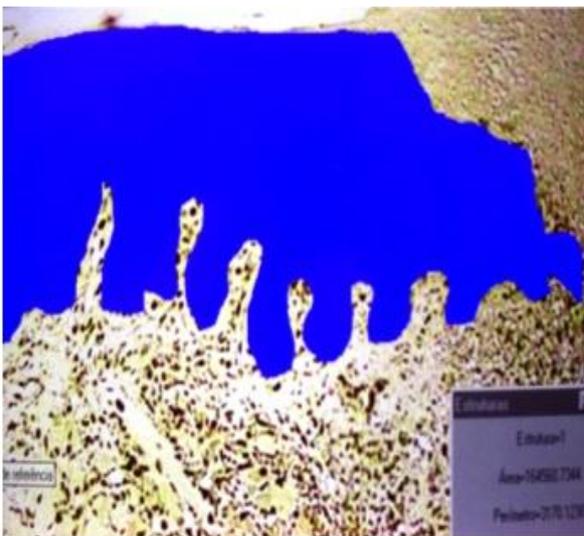


Fig. 4.4.1 Cálculo da área do epitélio utilizando-se software de morfometria digital em uma das bordas da ferida.

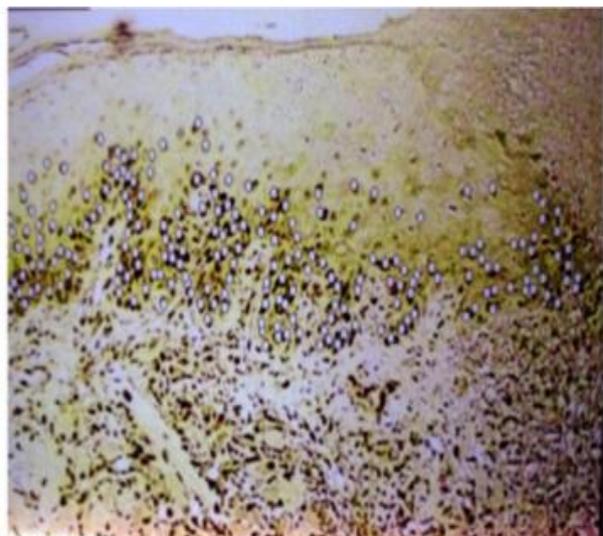


Fig. 4.4.2 Quantificação dos queratinócitos PCNA-positivos no epitélio de uma das bordas da ferida.

4.5 Análise estatística

Foi realizada análise estatística descritiva utilizando-se média, mediana, desvio-padrão e percentis máximo e mínimo.

Para análise das diferenças entre todos os grupos concomitantemente, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis. Para análise dos grupos dois-a-dois foi empregado o teste de Mann-Whitney ajustado pela correção de Bonferroni. Quando pertinente, utilizou-se o teste de Friedman seguido do teste dos postos sinalizados de Wilcoxon para verificar as diferenças entre os períodos experimentais para cada grupo individualmente. O nível de significância adotado foi de 5%.

RESULTADO

Fig. 5.1 ilustra os cortes nos tempos 0h e 24H

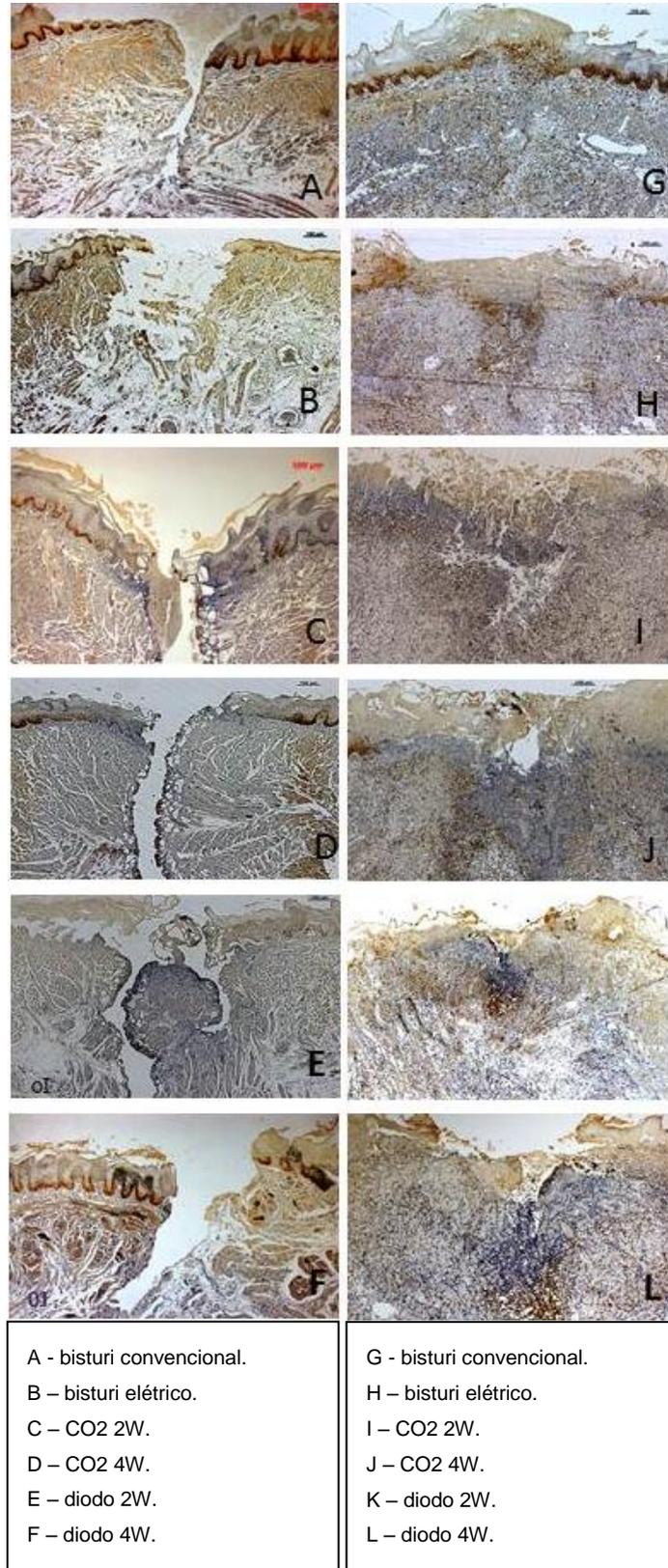


Gráfico 1

O gráfico 1 contém a distribuição dos valores médios da área do epitélio das bordas da ferida nos períodos de 0h e 24h. Em ambos os períodos houve diferenças significativas ($p=0,0040$ para 0h e $p=0,0150$ para 24h). Em 0h, o *laser* de CO_2 2W exibiu a maior média de área epitelial, a qual foi significativamente maior em relação aos demais grupos ($p=0,0210$ para todos os cruzamentos); a segunda maior área epitelial foi a do *laser* de diodo 2W, havendo diferenças significativas em relação aos bisturis e ao *laser* de diodo 4W ($p=0,0210$ para todos os cruzamentos). O *laser* de CO_2 4W ainda exibiu área epitelial significativamente maior do que o *laser* de diodo 4W ($p=0,0830$).

Em 24h, a média da área de epitélio aumentou em relação a 0h nos grupos dos bisturis e do *laser* CO_2 2W, mas isso não aconteceu nos demais *lasers*. O *laser* de CO_2 2W continuou exibindo área epitelial significativamente maior do que os demais grupos ($p=0,0210$ e $p=0,0340$). A menor área epitelial nesse período foi a do diodo 4W, com diferenças significantes em relação aos bisturis e ao *laser* de CO_2 ($p=0,0210$ e $p=0,0340$).

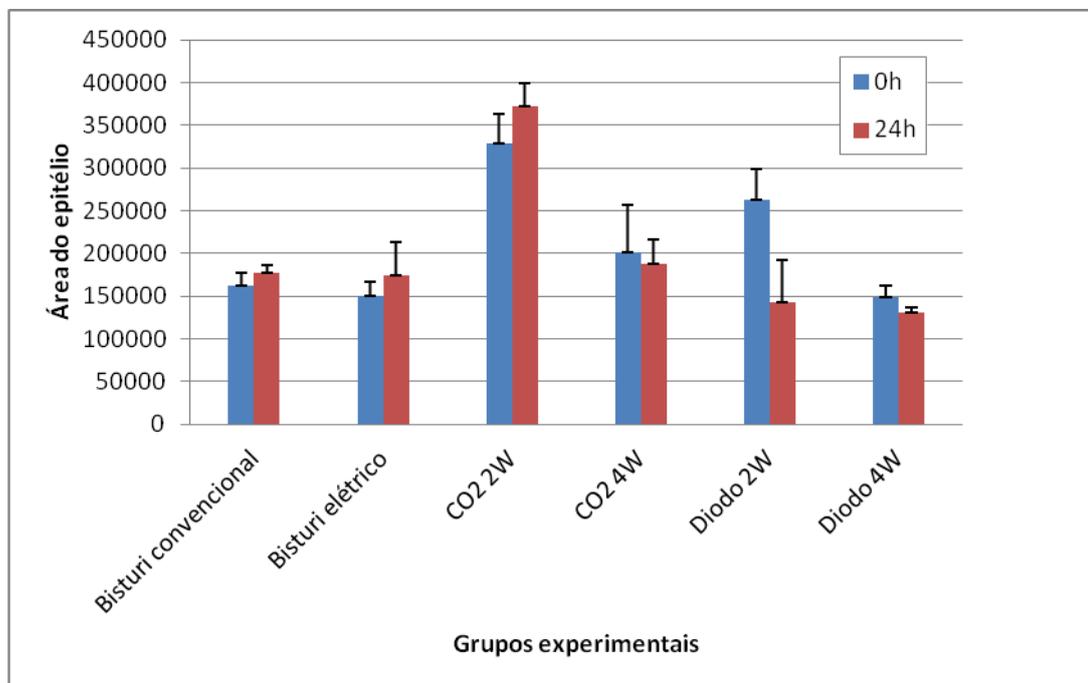
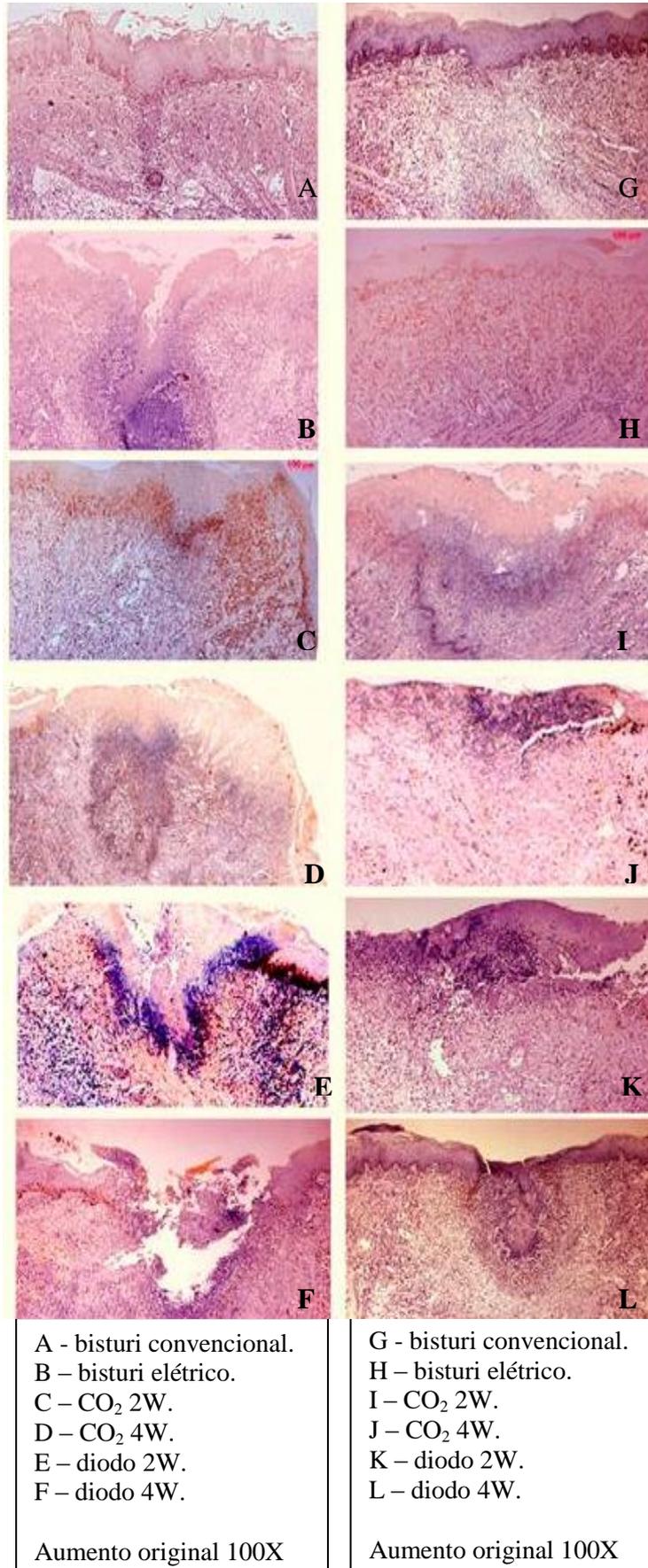


Gráfico 1 – Média (\pm desvio-padrão) da área epitelial (em μm^2) nas bordas da ferida para os períodos de 0h e 24h

Área do epitélio das bordas da ferida nos períodos de 48h e 72h

Fig. 5.2 Cortes histológicos das incisões no tempo 48h e 72h



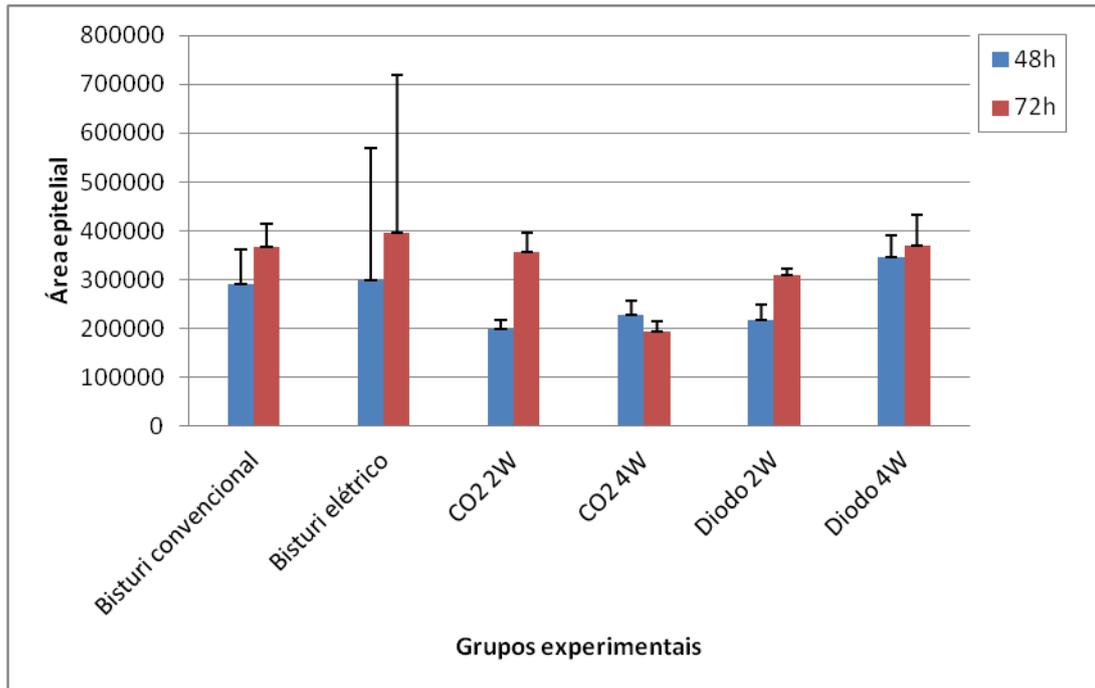
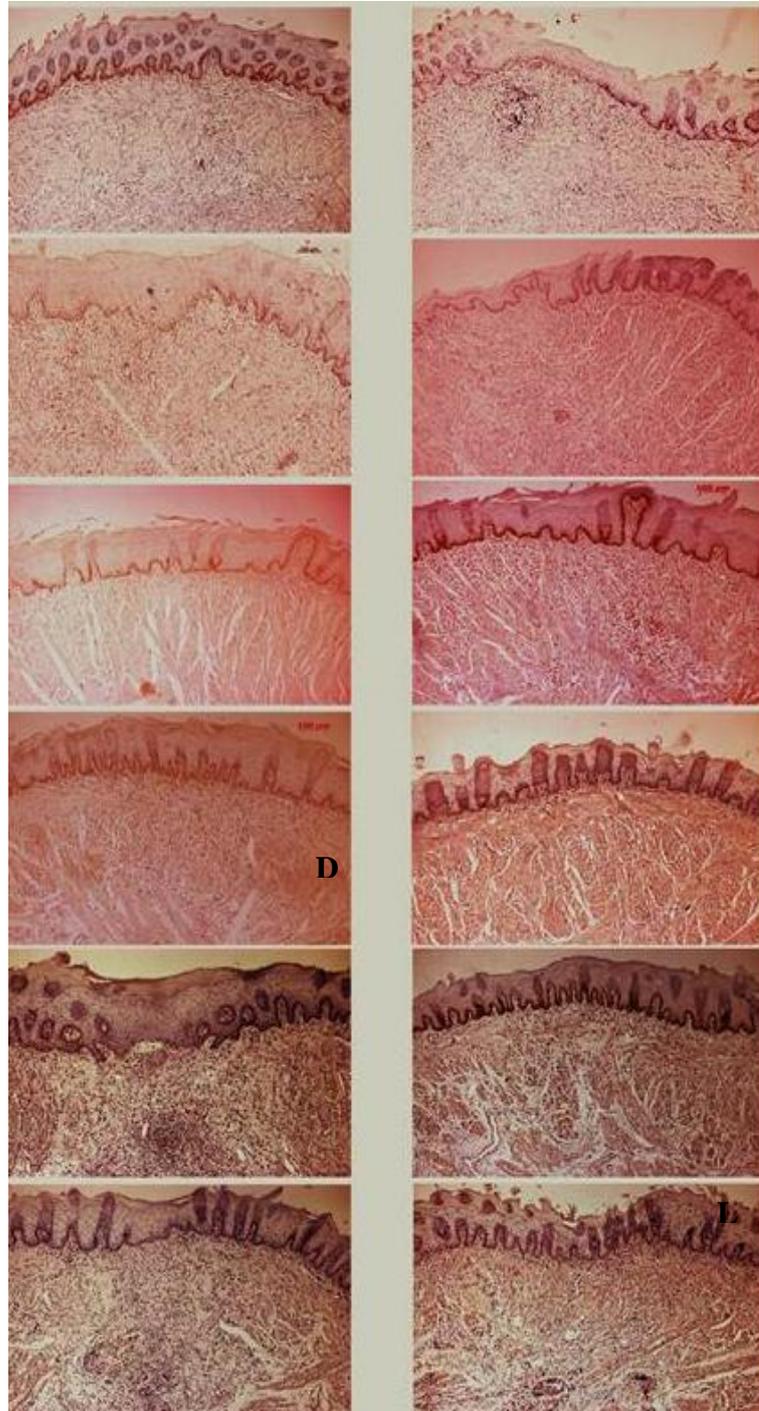


Gráfico 2 – Média (\pm desvio-padrão) da área epitelial (em μm^2) nas bordas da ferida para os períodos de 48h e 72h

Gráfico 20 Gráfico 2 exibe a distribuição dos valores médios da área epitelial para os períodos de 48h e 72h. Na análise de todos os grupos concomitantemente, houve diferenças significativas para os dois períodos ($p=0,0120$ para 48h e $p=0,0220$ para 72h). Em 48h, a área epitelial presente nos espécimes dos bisturis é praticamente o dobro da observada em 24h (Gráfico 1). O *laser* de diodo 4W também exibiu a mesma tendência, sendo o grupo com maior área epitelial em 48h, com diferenças estatisticamente significantes em relação ao bisturi elétrico e aos demais grupos de *lasers* ($p=0,0430$ para o bisturi elétrico e $p=0,0210$ para os *lasers*)

Área do epitélio das bordas da ferida nos períodos de 7 e 14 dias

A Fig. 5.3 ilustra os cortes nos tempos 7 e 14 dias



A - bisturi convencional.
 B – bisturi elétrico.
 C – CO₂ 2W.
 D – CO₂ 4W. intenção
 E – diodo 2W.
 F – diodo 4W

Aumento original 100X

G - bisturi convencional.
 H – bisturi elétrico.
 I – CO₂ 2W.
 J – CO₂ 4W. intenção
 k – diodo 2W.
 L – diodo 4W

Aumento original 100X

Gráfico 3

No Gráfico 3 tem-se a distribuição dos valores médios de área epitelial para os períodos de 7 dias e 14 dias. Na análise de todos os grupos concomitantemente, houve diferenças estatisticamente significantes somente para o período de 7 dias ($p=0,0200$). Em 7 dias, a maior área epitelial é observada para o *laser* de diodo 4W, seguido pelo grupo do *laser* de CO₂ 4W. Ambos os *lasers* evidenciaram área epitelial significativamente maior em relação ao bisturi convencional e ao bisturi elétrico (para ambos os bisturis, $p=0,0340$ quando comparado ao *laser* de CO₂ 4W e $p=0,0210$ quando comparado ao *laser* de diodo 4W). O *laser* de diodo 4W teve área epitelial significativamente maior também em relação ao *laser* CO₂ 2W ($p=0,0430$). Em 14 dias, os valores médios de área epitelial exibem queda em relação a 7 dias em praticamente todos os grupos, com valor menor para o grupo do *laser* CO₂ 2W. Não houve diferenças estatisticamente significantes nesse período experimental.

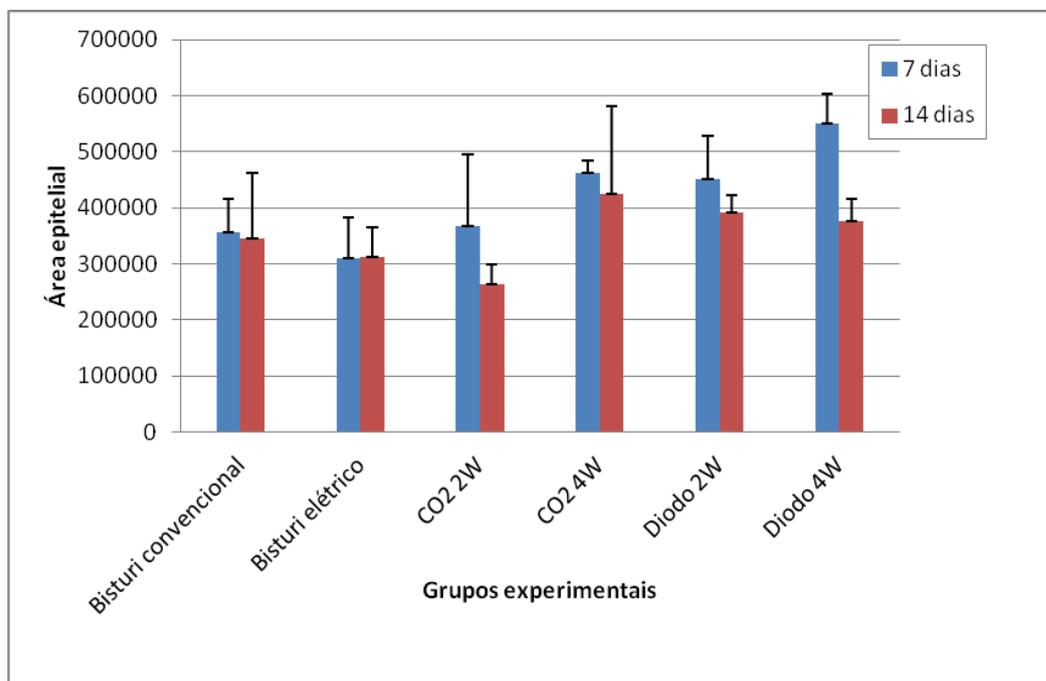


Gráfico 3 – Média (\pm desvio-padrão) da área epitelial (em μm^2) nas bordas da ferida para os períodos de 7 dias e 14 dias

À guisa de facilitar a visualização das tendências de área epitelial em termos cronológicos, o Gráfico 4 reúne a distribuição dos valores médios de cada grupo segundo todos os períodos experimentais. A análise das tendências já foi explicitada a partir dos gráficos anteriores.

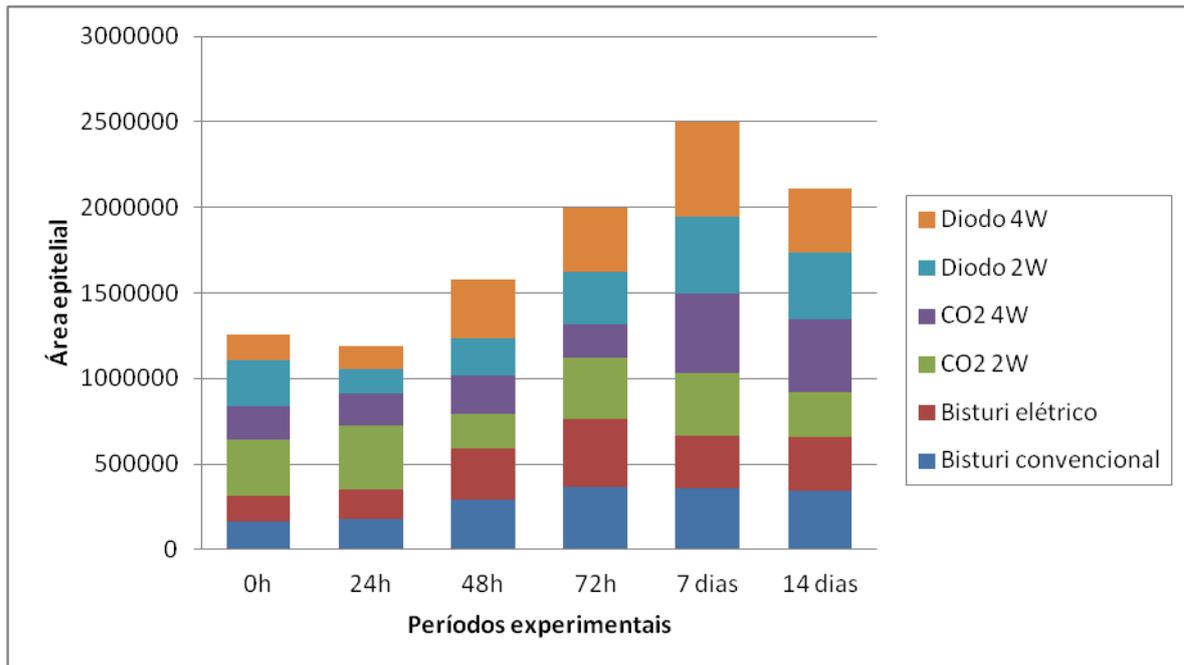


Gráfico 4 – Média (\pm desvio-padrão) da área epitelial (em μm^2) nas bordas da ferida para todos os grupos e períodos experimentais

5.2 Contagem de queratinócitos PCNA-positivos e densidade dessas células

A densidade de células PCNA-positivas foi expressa em queratinócito positivo/ μm^2 de epitélio a partir da contagem individual e da medida da área epitelial. Para facilitar a interpretação, a análise da contagem das células positivas será realizada concomitantemente à densidade celular. Na densidade celular, os valores menores indicam maior número de células por μm^2 de epitélio.

O Gráfico 5 contém a distribuição do número médio de células positivas e o Gráfico 6, a densidade média celular nos períodos de 0h e 24h. Ao se analisarem todos os grupos concomitantemente, houve diferenças estatisticamente significantes tanto na contagem individual das células ($p=0,0020$ para 0h e $p=0,0080$ para 24h) quanto na densidade celular ($p=0,0010$ para 0h e $p=0,0140$ para 24h). Em 0h, o número de queratinócitos positivos no grupo bisturi convencional foi estatisticamente superior em relação a todos os demais grupos ($p=0,0210$ para todos os cruzamentos). Para o bisturi elétrico, o número de células positivas foi significativamente superior aos *lasers* de CO_2 2W e diodo 2W e 4W ($p=0,0210$). O *laser* CO_2 4W exibiu a segunda maior contagem média de células positivas, sendo significativamente superior aos *lasers* de diodo 2W e 4W, mas sem diferenças em relação ao CO_2 2W. Com relação à densidade celular, observa-se que os grupos dos bisturis exibiram alta densidade de células positivas em relação aos grupos dos *lasers* ($p=0,0210$ para todos os cruzamentos) no período de 0h. A baixa densidade de células positivas no grupo do *laser* de diodo 2W foi estatisticamente significante somente em relação ao *laser* de CO_2 4W ($p=0,0430$) e ao de diodo 4W ($p=0,0210$). Em 24h, os bisturis juntamente com o *laser* de CO_2 4W mantiveram o maior número de queratinócitos PCNA-positivos, havendo diferenças significativas entre o bisturi elétrico e os *lasers* de CO_2 2W e diodo 2W e 4W ($p=0,0210$ para todos os cruzamentos). O *laser* de diodo 4W exibiu os menores índices, os quais foram estatisticamente significantes em relação ao bisturi elétrico e ao *laser* de CO_2 4W ($p=0,0210$). Acompanhando essa tendência na contagem, os grupos que exibiram menores quantidades de células positivas exibiram menores densidades celulares, com diferenças estatísticas principalmente entre o bisturi elétrico e os *lasers* de CO_2 2W e diodo 2W e 4W ($p=0,0210$ para todos os cruzamentos).

O Gráfico 5 contém a distribuição do número médio de células positivas nos períodos de 0h e 24h

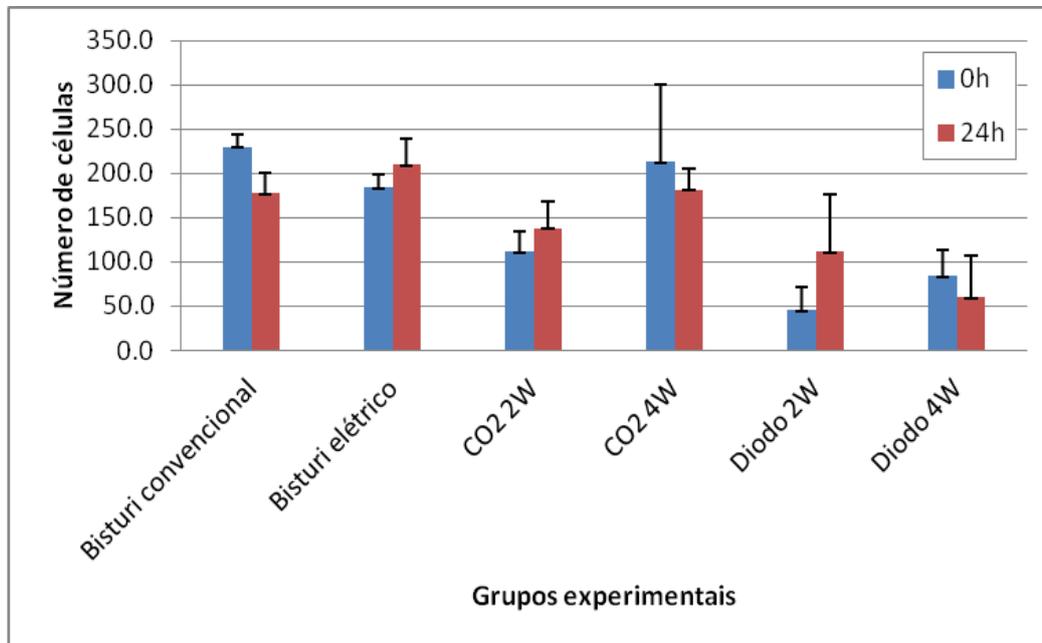


Gráfico 5 – Número médio (\pm desvio-padrão) de queratinócitos PCNA-positivos nos períodos experimentais de 0h e 24h.

O Gráfico 6 contém a densidade média celular nos períodos de 0h e 24h.

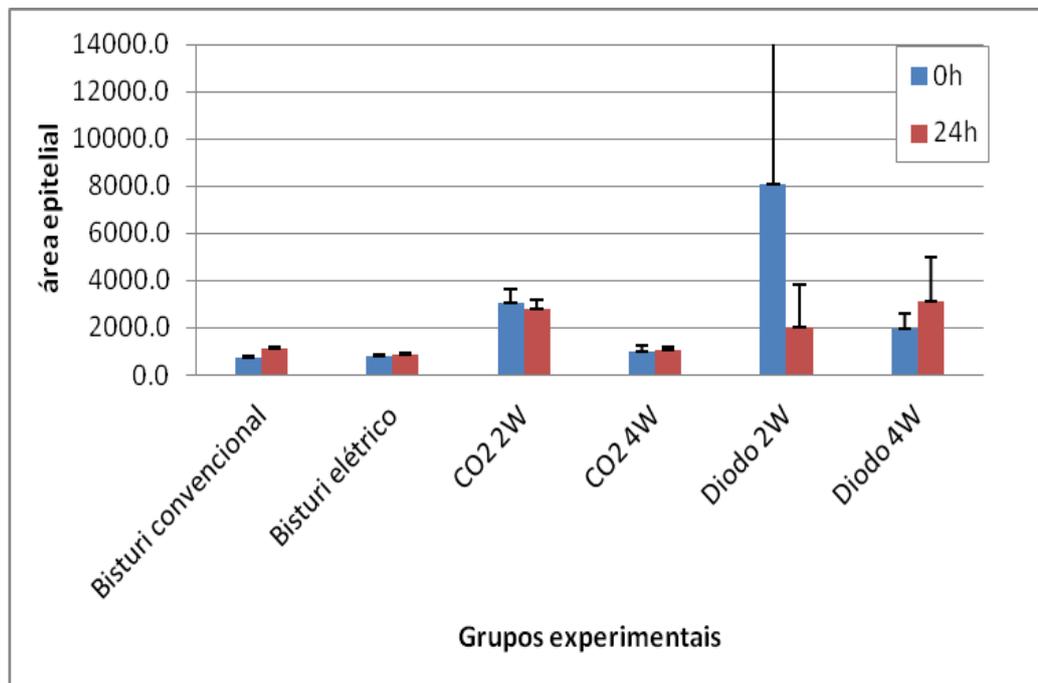


Gráfico 6 – Densidade média (\pm desvio-padrão) de queratinócitos PCNA-positivos por área epitelial (em μm^2) nos períodos experimentais de 0h e 24h

Os Gráficos 7 e 8 contêm, respectivamente, a distribuição do número médio de queratinócitos PCNA-positivos e da densidade de células positivas para os períodos experimentais de 48h e 72h.

Para a contagem de células positivas (Gráfico 7), houve diferenças estatisticamente significantes nos períodos de 48h ($p=0,0080$) e 72h ($p=0,0380$) ao se compararem todos os grupos concomitantemente. Já para a densidade celular, houve diferenças somente no período de 72h ($p=0,0040$). Na contagem de células PCNA-positivas no período de 48h, os maiores valores encontram-se nos grupos do bisturi elétrico e do *laser* de diodo 4W. O bisturi elétrico exibiu número médio de células positivas significativamente maior em relação ao bisturi convencional ($p=0,0430$) e aos *lasers* de CO₂ 2W e 4W ($p=0,0210$). O *laser* de CO₂ 2W foi o grupo com menor número de células positivas ($p=0,0210$ para o bisturi elétrico e os demais *lasers*).

O Gráfico 7 contém, a distribuição do número médio de queratinócitos PCNA-positivos para os períodos experimentais de 48h e 72h. Em 72h, o grupo do *laser* de diodo 2W apresentou o maior número de células positivas, com diferenças significativas em relação ao *laser* de CO₂ 2W e diodo 4W.

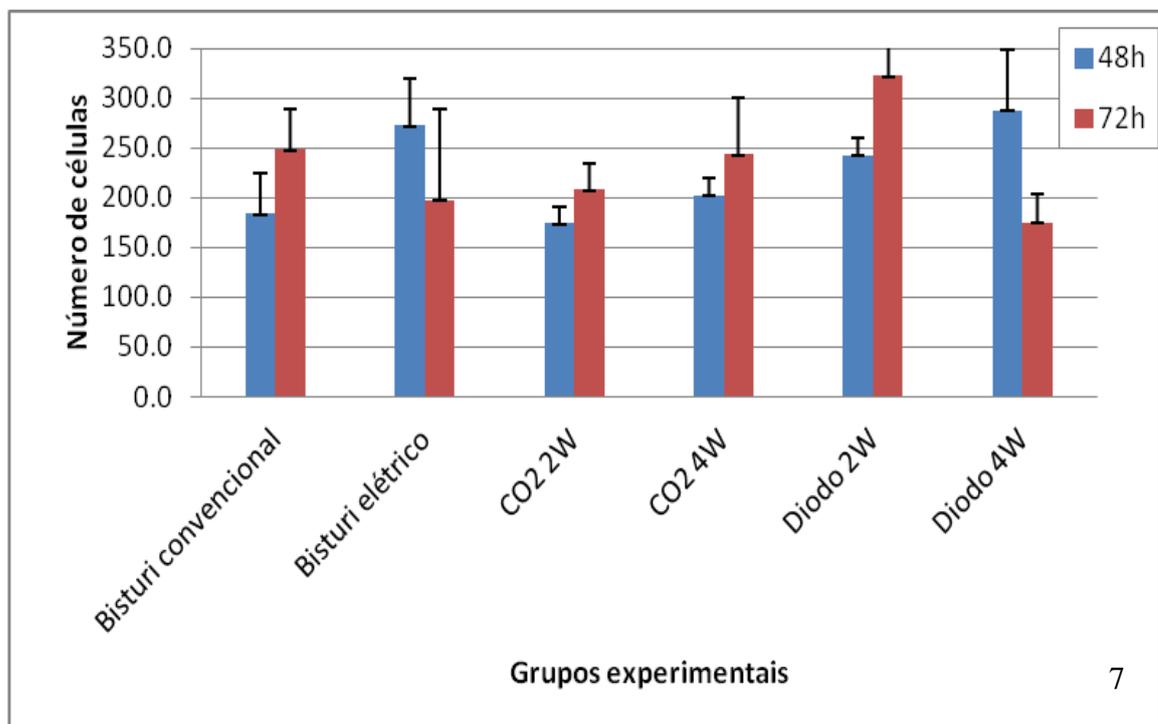


Gráfico 7 – Número médio (\pm desvio-padrão) de queratinócitos PCNA-positivos nos períodos experimentais de 48h e 72h.

Para a densidade celular (Gráfico 8), nota-se que em 48h os valores foram semelhantes entre os grupos, não havendo diferenças entre eles. Porém, em 72h, o *laser* de diodo 4W exibe menor densidade de células positivas, com diferenças significantes em relação ao bisturi convencional e ao diodo 2W e CO₂ 4W ($p=0,0210$ para todos os cruzamentos).

O Gráfico 8 contém a distribuição da densidade de células positivas para os períodos experimentais de 48h e 72h.

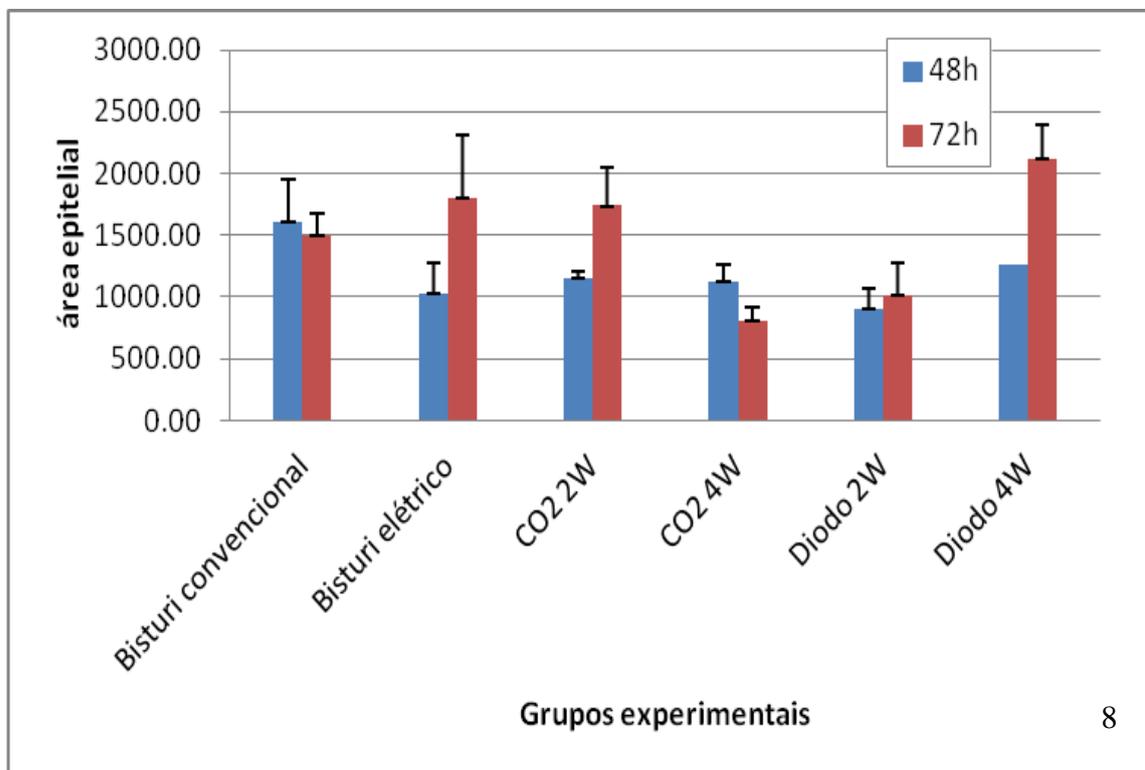


Gráfico 8 – Densidade média (\pm desvio-padrão) de queratinócitos PCNA-positivos por área epitelial (em μm^2) nos períodos experimentais de 48h e 72h

Os Gráficos 9 e 10 mostram, respectivamente, a distribuição dos valores médios de células PCNA-positivas e de densidade celular para os períodos experimentais de 7 dias e 14 dias. Na análise de todos os grupos concomitantemente, nota-se que houve diferenças estatísticas somente no período de 14 dias para a contagem de células ($p=0,0380$) e no período de 7 dias para densidade celular ($p=0,0180$). Em 7 dias, as células PCNA-positivas foram mais numerosas no grupo do bisturi convencional, porém os valores médios foram bem semelhantes entre todos os grupos. Em 14 dias, há um pico de queratinócitos positivos para os grupos do bisturi elétrico e para os *lasers* de CO₂ 4W e diodo 4W. Houve diferenças significativas na comparação do bisturi elétrico com o bisturi convencional ($p=0,0340$) e com o *laser* de CO₂ 2W e diodo 2W ($p=0,0210$ para ambos os cruzamentos). O *laser* de CO₂ 4W exibiu ainda diferenças em relação ao CO₂ 2W. As diferenças do *laser* diodo 4W não foram significantes nesse período.

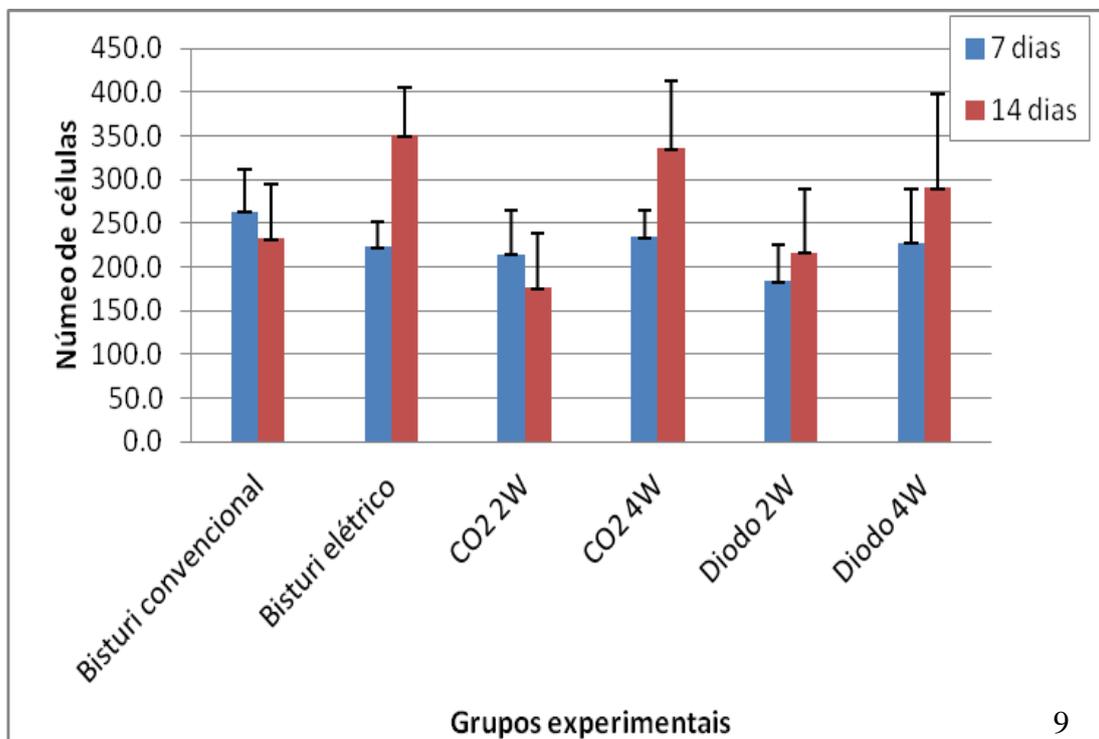


Gráfico 9 – Número médio (\pm desvio-padrão) de queratinócitos PCNA-positivos nos períodos experimentais de 7 dias e 14 dias

Na análise da densidade celular (Gráfico 10) no período de 7 dias, notase que as maiores densidades de células positivas encontram-se para os grupos dos bisturis e para os *lasers* de CO₂. Os bisturi convencional exibiu densidade de células positivas significativamente maior do que o *laser* de CO₂ 4W (p=0,0340) e os *lasers* de diodo 2W e 4W (p=0,0210 para ambos os cruzamentos). O bisturi elétrico também exibiu densidade significativamente maior em relação aos *lasers* de diodo 2W (p=0,0430) e 4W (p=0,0210). Entre os *lasers* não houve diferenças estatísticas no período de 7 dias. Em 14 dias, também não houve diferenças significativas entre as densidades de células PCNA-positivas.

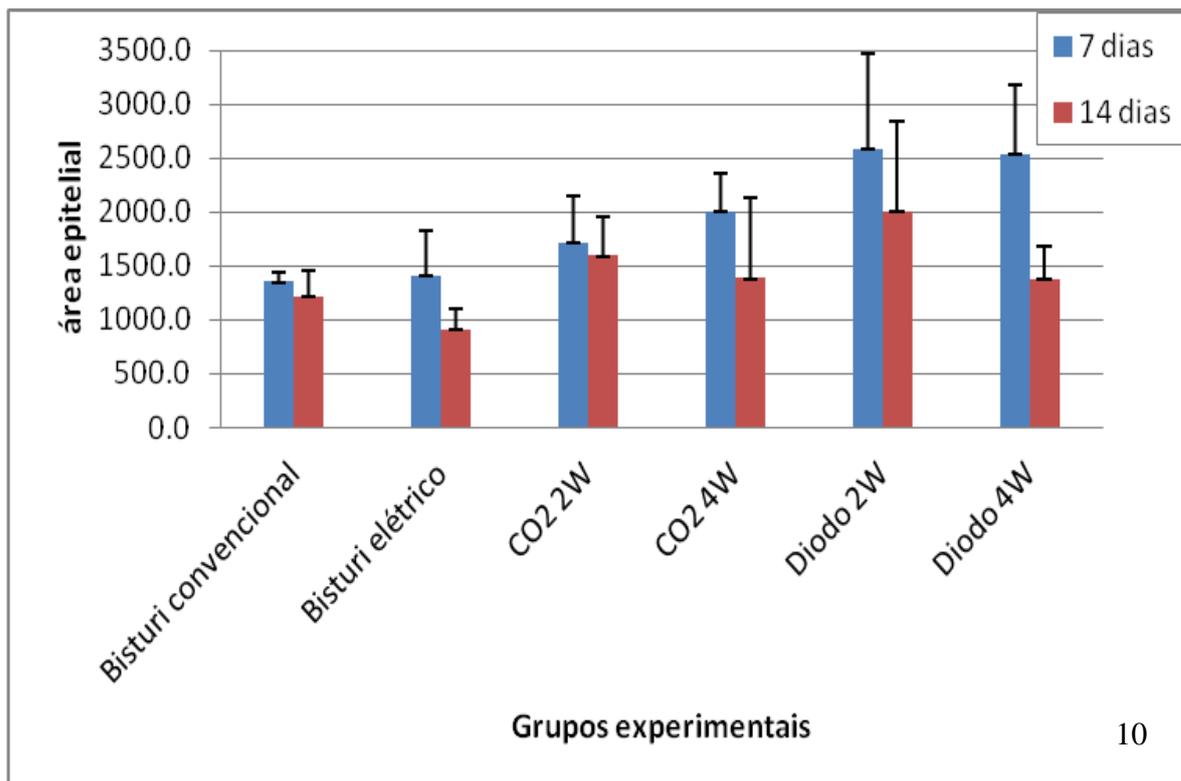


Gráfico 10 – Densidade média (\pm desvio-padrão) de queratinócitos PCNA-positivos por área epitelial (em μm^2) nos períodos experimentais de 7 dias e 14 dias

Para resumir as tendências de distribuição do número de células PCNA-positivas e de densidade celular positiva em termos cronológicos, foram criados os Gráficos 11 e 12, respectivamente. As interpretações das diferentes tendências já foram feitas a partir dos gráficos anteriores.

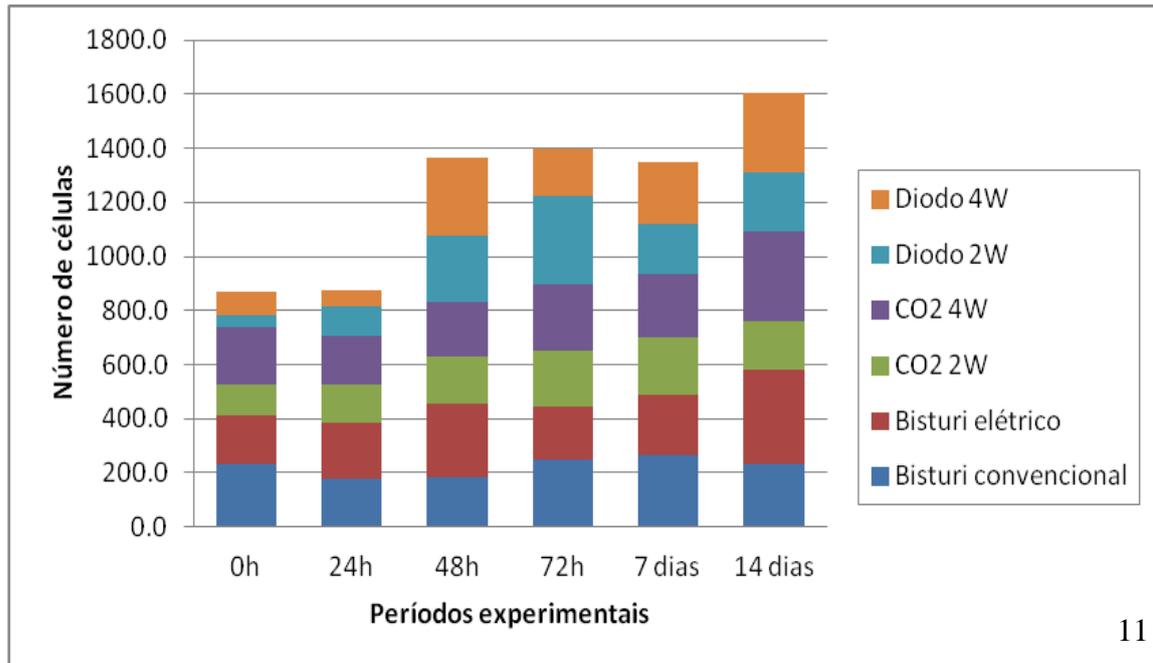


Gráfico 11 – Número médio (\pm desvio-padrão) de queratinócitos PCNA-positivos segundo os grupos e períodos experimentais

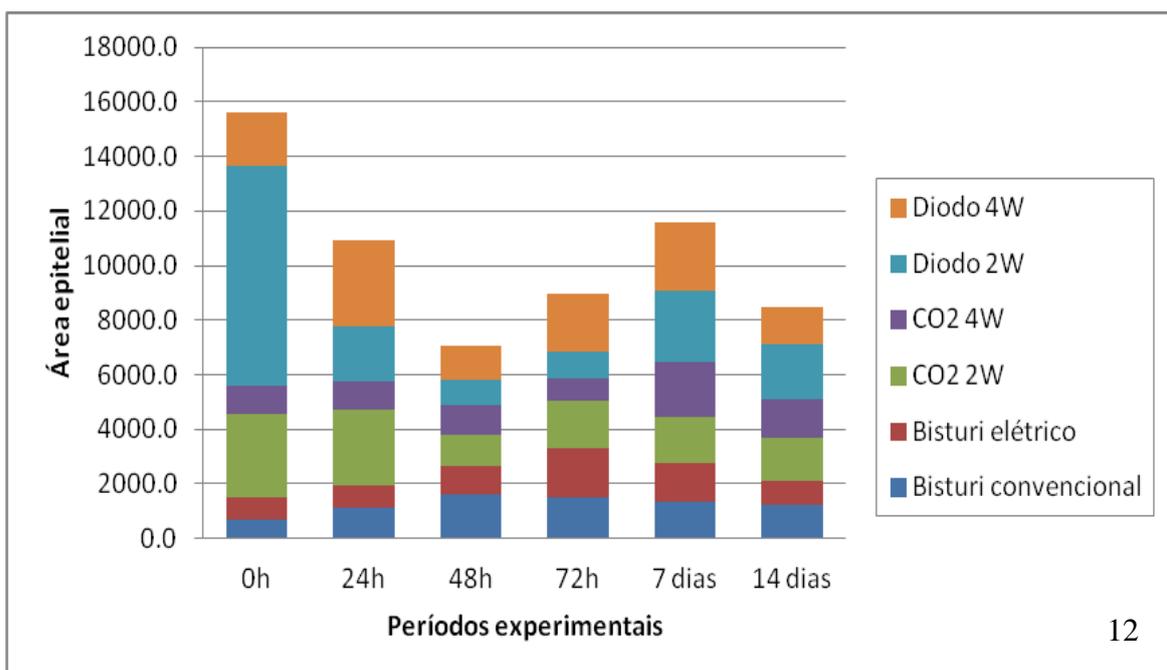


Gráfico 12 – Densidade média (\pm desvio-padrão) de queratinócitos PCNA-positivos por área epitelial (em μm^2) segundo os grupos e períodos experimentais

6 DISCUSSÃO

“Com suas múltiplas funções, o laser é, sem dúvida, a invenção mais impactante do mundo moderno”, diz o físico Nilson Dias Vieira Junior, superintendente do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN).

O uso do laser na área médica e odontológica está cada vez mais acessível ao profissional e, conseqüentemente, ao paciente. Porém, um dos efeitos mais preocupantes para esses operadores é o dano térmico, que pode retardar o processo de cicatrização.^{40,42,48,59,60}

A interação da luz laser com os tecidos pode levar a diferentes resultados, tanto inibindo, quanto acelerando a proliferação celular.¹⁴ Esses resultados dependem de vários fatores, desde comprimento de onda, dose, potência e propriedades ópticas dos tecidos, como também das condições de saúde do indivíduo, ou seja, a características fisiológicas das células.⁸²

Estudos a este respeito têm sido realizados por análise morfométrica, comparando os danos causados pelos instrumentos cirúrgicos. A base desta pesquisa foi avaliar e comparar as fases da reparação tecidual em mucosa oral de ratos submetidos a incisões de dimensões padronizadas, realizadas com *lasers* (CO₂ e diodo), com bisturi elétrico e convencional. As formas de análise das fases de reparação entre as incisões foram baseadas na área do epitélio das bordas da ferida, contagem de queratinócitos PCNA-positivos e densidade dessas células, ocorrido imediatamente após as incisões e em múltiplas etapas da reparação. Isso gerou um conjunto de dados que permitiu uma análise abrangente comparativa da reparação da mucosa da língua entre as técnicas utilizadas.

Quanto às técnicas realizadas com bisturi convencional foi observado que houve sangramento e formação de crosta na borda na ferida.^{73, 83, 84} Diferentemente do que foi observado nas cirurgias com laser, em que não houve sangramento, nem crosta na borda da ferida:⁸³ ou mesmo eletrocautério⁸⁴

A ação de fotocoagulação do laser, observada também em nosso experimento, é significativa sobre os métodos cirúrgicos convencionais, visto que, diferentemente de uma incisão com bisturi cirúrgico, o cirurgião dentista passa a ter um campo de visão muito mais adequado para o trabalho, abreviando o tempo das intervenções.

A nosso ver, o efeito de coagulação é considerado como a principal vantagem das cirurgias com laser de acordo com alguns autores citados acima.^{47, 66, 73, 58}

O primeiro aspecto analisado foi a área do epitélio nos períodos iniciais de reparo (0h e 24h) das incisões lineares (gráfico 1) e foi observado a presença de discreta necrose epitelial nas bordas da ferida, com sinais de início de reepitelização em 24h. As bordas epiteliais das feridas feitas com os bisturis exibiam formato homogêneo e regular, o que justifica menores valores de área epitelial. Ambos exibem em 24h sinais da reepitelização esperada para essa fase, o que pode justificar o aumento da área epitelial nesse período.

Os maiores valores de área epitelial para os *lasers* de CO₂ 2W e diodo 2W estão atrelados a presença de dano térmico associada a bordas irregulares, porém nítidas, com presença de queratinócitos viáveis na extensão epitelial. Provavelmente, essas bordas irregulares se devem a sucessivas irradiações totalizando 4s para poder se alcançar 2,5mm de extensão por 1mm de profundidade.

O atraso na reação à inflamação de feridas provocadas por laser é constatado diversas vezes na literatura atual,^{10, 13, 14, 69, 52, 73, 74,} relatam que a lesão causada pelo aquecimento, ou seja, o grau de necrose nas margens da lesão é, provavelmente, uma das razões da velocidade de cicatrização mais lenta e da reação inflamatória mais evidente das feridas induzidas a laser. Ao contrário de outros autores que utilizaram a mesma potência de 2W, modo contínuo, e não foi observado atraso na cronologia do processo de reparo com o uso do laser de CO₂. Concluíram que com os parâmetros utilizados, o laser contribui para anastomoses de nervos, devido à coagulação térmica.⁵⁸

O aumento de área do epitélio em 24h do *laser* CO₂ 2W também está atrelado a sinais de reepitelização, porém mais discreta do que a observada para os bisturis. Já o parâmetro de 4W, particularmente o *laser* de diodo, gerou grande dano térmico, com destruição maciça de queratinócitos, justificando a menor área epitelial em relação ao parâmetro de 2W. Utilizando a potência de 4W no laser de diodo, a agressão térmica é intensa, o que resulta em maior dano tecidual, aspecto também relatado no estudo de Romanos em 2004.⁷⁴

O período de 24h demonstra a recuperação ou o acionamento da divisão mitótica dos queratinócitos como resposta à perda da continuidade epitelial devido a incisão. O bisturi elétrico constitui o exemplo dessa recuperação, quando exhibe a

maior taxa de células PCNA-positivas. Os lasers de 2W parecem também recuperar sua capacidade proliferativa nesse período, aumentando sua densidade celular.

O laser de CO₂ 4W continua exibindo valores bem altos de proliferação e alta densidade celular, e o laser de diodo 4W, os menores, apesar de exibir discreto aumento da densidade celular em relação a 0h. Isso indica que a irradiação dos dois tipos de lasers, apesar de estarem com parâmetros de potência iguais, gera efeitos diferentes sobre a capacidade de recuperação proliferativa dos queratinócitos. Essa diferença pode residir na alta quantidade de dano térmico gerada pelo laser de diodo nessa potência, fato já discutido quando da interpretação dos baixos valores de área epitelial presentes nesse grupo em 24h.

Entre os períodos de 48h e 72h, há a formação do tecido de granulação, o que favorece substancialmente a reepitelização (gráfico 2). Nessa fase, há o pico de reepitelização, com tendência a se observarem áreas epiteliais amplas.³¹ Isso se confirmou em todos os grupos, inclusive com o laser de diodo 4W, que exibia área epitelial bem inferior a dos demais grupos no período de 24h. Nota-se que os Gráficos 1 e 2 demonstraram uma tendência bifásica de aumento/diminuição da área epitelial, ou seja, parece existir um aumento compensatório de área epitelial em período subsequente a um em que o epitélio não aumentou (por exemplo, no laser de diodo 4W comparando-se 24h com 48h) e vice-versa, ou seja, diminuiu quando aumentou muito em período anterior (por exemplo, no laser de CO₂ 2W comparando-se também 24h com 48h). Vale dizer que alguns espécimes do laser de CO₂ 2W já exibiam ausência de exposição do tecido conjuntivo, ou seja, reepitelização bem avançada, a semelhança do observado para os bisturis. Provavelmente, o dano térmico produzido pelo CO₂ 2W foi menor que o produzido quando utilizado 4W, e também em relação aos dois parâmetros do laser de diodo e do bisturi elétrico. Foi comparado a zona de dano térmico nas bordas das biópsias excisionais em mucosa oral de pacientes realizadas com laser de CO₂ e laser de diodo e concluíram que o laser de CO₂ apresentou zona de dano térmico mais estreita do que do laser de diodo. Isso pode ser explicado quando se compara a penetração óptica do laser de diodo que é de até 10.000 nm^{6, 85} O dano térmico em tecidos moles estenderam de 28,3 µm a 98 µm, independentemente dos parâmetros do laser e utilizados. Os comprimentos de onda de lasers de diodo [gálio-alumínio (Gaal) 0,9 µm; arseneto de gálio-alumínio (GaAlAs) 0,7-0,9 µm; e fosfeto de arseneto de gálio índio (InGaAsP) 1,2-1,6 µm] são minimamente absorvidos, embora

com penetração máxima no tecido, enquanto o *laser* de CO₂ tem grande absorção na superfície do tecido e penetração mínima.⁸⁶ Em relação ao bisturi elétrico, estudos têm mostrado a denaturação de tecido até 1mm lateral do ponto cirurgia com bisturi elétrico⁶

Em 7 e 14 dias, a reepitelização na mucosa lingual já está completa, havendo pico do remodelamento epitelial por volta do sétimo dia (gráfico 3). Nota-se que ainda os lasers de 4W exibem valores de área epitelial bem altos, o que pode indicar uma resultante de proliferação epitelial ainda nesses grupos, com remodelamento, ou seja, adequação da área epitelial a um estado de equilíbrio ainda incipiente em comparação aos demais grupos, principalmente aos bisturis. Entretanto, o atraso na cronologia do processo de reparo quando comparada à incisão com bisturi, não apresentou significância clínica.⁷³

Em 14 dias, ainda que os lasers de maior potência e o de diodo 2W exibam área epitelial maior, há uma tendência entre os grupos de exibirem espessura epitelial que se aproxima dos níveis de remodelamento muito próximos. Outros estudos também demonstraram que a reepitelização completa ocorre entre 7 a 14 dias independentemente do instrumento utilizado^{32, 53, 62, 74}, porém nenhum outro estudo relatou sobre a espessura tecidual.

Quanto a contagem de queratinócitos PCNA-positivos (gráfico 5) e densidade dessas células (gráfico 6), o período de 0h é caracterizado por exibir os níveis residuais da capacidade proliferativa dos queratinócitos após a incisão epitelial. Nota-se que o grupo do bisturi convencional manteve a capacidade proliferativa dessas células, exibindo alta densidade de células positivas. Já o bisturi elétrico exibiu certa perda em relação ao bisturi convencional. Com relação aos *lasers*, o de CO₂ 4W parece ter sido o único que manteve a capacidade de divisão mitótica nos queratinócitos, destacando-se principalmente em relação aos *lasers* de diodo, os quais nitidamente perderam certa atividade proliferativa após a irradiação. É interessante observar que a densidade de células positivas para o *laser* de CO₂ 4W foi estatisticamente superior a do CO₂ 2W. Pode-se explicar isso pela menor área epitelial presente no *laser* de CO₂ 4W, já que não houve diferenças significantes em relação a contagem das células entre os dois grupos. Como já foi dito anteriormente, a ablação do *laser* CO₂ 2W gerou bordas mais irregulares, porém manteve os queratinócitos viáveis para divisão mitótica, fato que pode explicar as diferenças

entre os dois grupos. Outros estudos com *laser* de CO₂ demonstraram que quanto maior a potência utilizada, pior foi a reparação do tecido ^{47, 58}

Quanto aos períodos de 48h e 72h, há uma tendência de se aumentarem os níveis proliferativos dos queratinócitos, já que a reepitelização encontra-se em seu maior pico. A tendência bifásica de alternância entre aumentar e diminuir a área epitelial também se faz presente na quantidade de células positivas para PCNA. Nota-se que no gráfico 7, principalmente no grupo dos bisturis, uma maior ou menor quantidade de células positivas para PCNA em função do tempo, desde 0h até 72h. O *laser* de diodo 4W, que até então não demonstrava índices altos de proliferação, passou a expressar maior quantidade de PCNA em 48h, indicando certa recuperação dos níveis mitóticos. Porém, em 72h, a densidade celular nesse grupo cai drasticamente em relação aos outros *lasers* (gráficos 8). Um ponto importante é certa manutenção do número de células positivas e da densidade celular nos *lasers* de CO₂ 2W e 4W, os quais parecem exibir taxas mais homogêneas e contínuas de proliferação.

Nos períodos de 7 dias e 14 dias, ocorre o remodelamento do epitélio, ou seja, há uma oscilação de proliferação celular em relação a morte celular, no sentido de ajustar a espessura do epitélio a um ponto de equilíbrio no tecido. Observa-se que o bisturi convencional em 7 dias exibe intensa proliferação (gráficos 9), bem como alta densidade de células positivas para o PCNA no epitélio (gráficos 10). Porém, em 14 dias, há uma queda abrupta dessa proliferação em comparação ao grupo do bisturi elétrico e dos *lasers* de 4W. Provavelmente esses grupos estejam manifestando índices de remodelamento epitelial maiores em 14 dias. Considerando-se que as propriedades de resistência a tração e compressão de um tecido são adquiridas a medida que avança o remodelamento, pode-se depreender que os *lasers* de 4W provavelmente estejam ainda com níveis menores de resistência a forças mecânicas, o que pode implicar clinicamente em maior fragilidade tecidual. No estudo de Taylor et al, foi descrito que as forças de ruptura e tensão feitas com bisturi foram significativamente maiores que as observadas nas incisões realizadas com os *lasers*.⁸⁷

Novamente o *laser* de CO₂ 2W exibiu em 7 dias e 14 dias quantidade de células positivas dentro de um equilíbrio que se perpetua desde o período de 48h, mantendo também densidades celulares homogêneas. (gráficos 9 e 10)

Apesar das incisões serem feitas de modo linear, devemos lembrar que são dimensões reduzidas, pois na clínica diária, principalmente, quando utilizamos lasers de alta potência, são realizadas cirurgias de tecidos moles com grandes extensões (exemplos: leucoplasias, hiperplasias fibrosas inflamatórias, hiperplasias papilomatosas). Por isso, mais estudos são necessários nessa área para que se possa reproduzir o que é feito na prática ambulatorial.

Dentro do foi desenvolvido nesse estudo, foi possível observar diferenças na área do epitélio das bordas da ferida e na contagem de queratinócitos PCNA-positivos e densidade dessas células, mas ao final do processo, o resultado das análises obtidas foi semelhante.

Finalizando, é bastante importante a seleção do comprimento de onda, potência, dose ideais. Daí a importância em se determinar os parâmetros corretos para se conseguir o efeito desejado. De fato, a consagração do laser como terapia, exige um conhecimento da energia aplicada, uma investigação dos efeitos que produz no organismo e a aplicação de uma correta metodologia.

7 CONCLUSÃO

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

- Nos períodos iniciais do reparo (0h e 24h), o grupo dos lasers exibiu menor expressão do PCNA em relação ao bisturi convencional, indicando que a irradiação laser comprometeu, porém não totalmente e de forma transitória, os níveis normais de divisão mitótica tecidual nessa fase.
- O laser de diodo 4W foi o que exibiu menor expressão de PCNA nos períodos de 0h e 24h após a incisão.
- Durante o reparo das feridas, houve aumento gradativo da expressão do PCNA nos queratinócitos nos grupos dos lasers, com maior homogeneidade nesse aumento para o *laser* de CO₂ 2W.
- No período de remodelamento epitelial, o grupo dos lasers de 4W ainda apresenta alta expressão de PCNA em comparação ao bisturi convencional, indicando picos de remodelamento mais tardio em relação ao bisturi convencional.
- Os Lasers de CO₂ com 2W de potência e Diodo também com 2W de potência , no modo contínuo mostraram-se eficientes para remoção dos tecidos, preservando adequadamente as estruturas marginais à área tratada.

REFERÊNCIAS

1 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.

2 Abreu ME, Mezzomo LAM, Viegas VN, Pagnoncelli RM. Laser e sua utilização em frenectomia labial inferior – Relato de caso. *Rev. Odonto Ciência* 2002 jul.; Porto Alegre, 17(37): 250-253.

3 Angiero F, Parma L, Crippa R, Benedicenti S. Diode laser (808 nm) applied to oral soft tissue lesions: a retrospective study to assess histopathological diagnosis and evaluate physical damage *Lasers Med Sci*. 2011 Mar 9. [E pub ahead of print]

4 Prajwalit K, R, Monal Y, Bansuri J. Application of Diode Laser in Oral Biopsy: Removal of White Patch Over Tongue - A Case Report *JIDA*, Vol. 5, No. 9, September 2011

5 Ibrahim Tuncer, Ceyda Özçakır-Tomruk, Kemal Şencift, and Sedat Çöloğlu. *Photomedicine and Laser Surgery*. February 2010, 28(1): 75-79. Doi: 10.1089/pho.2008.2353.

6 Mavrogiannis M, Thomason JM, Seymour RA. A study comparing the efficacy of laser excision versus conventional gengivectomy in the management of drug – induced gingival overgrowth. *J. Clin. Period.* 2004.

7 Borrajo JLL, Varela LG, Castro GL, Rodriguez-Numes I, Torreira MG. Diode laser (980 nm) as adjunct to scaling and root planing. *Photome Laser Surg* 2004; 22(6):509-12.

8 Niemz HM. *Laser-tissue interactions fundamentals and applications*. 3° Ed. England: Springer; 2003. Cap.4, p.181-200.

9 GRIGOR'IAN AS, GRIGOR'IAN LA. Experimental-morphological study of the effects of diode laser scalpel with different irradiation parameters (wave length 0.97 mm) on oral mucosa. *Stomatologija (Mosk)*. v.85 n.1 p.8-13, 2006.

10 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.

11 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.

12 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.

13 Sinha UK, Gallagher LA. Effects of steel scalpel, ultrasonic scalpel, CO₂ laser and monopolar and bipolar electrosurgery on wound healing in guinea pig oral mucosa. *Laryngoscope* 2003;113:228-36.

14 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.

15 JAMES K. AVERY. *Desenvolvimento e Histologia Bucal*. Editora Artmed 3^o ed. 2005, p. 260-279.

16 Cormarck D. *Fundamentos de Histologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1996.Cap.13, p.224-232.

17 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.

18 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.

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

20 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

21 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.

22 ROBBINS L, CONTRAN R, KUMAR, V COLLINS T. Patologia Estrutural e Funcional. Editora Guanabara Koogan 6º ed. 2000, p. 79-100.

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

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

25 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.

26 Clark RAF. Wound repair: overview and general considerations. In: Clark RAF, editor. The molecular and cellular biology of wound repair. 2nd ed. New York: Plenum Press; 1996. p. 3-50

27 Martin P. Wound healing aiming for perfect skin regeneration. Science. 1997;276:75-81.

28 Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokine. *Physiol Rev.* 2003;83(3):835-70.

29 Zcharia E, Zilka R, Yaar A, Yacoby-Zeevi O, Zetser A, Metzger S et al. Heparanase accelerates wound angiogenesis and wound healing in mouse and rat models. *FASEB J.* 2005;19(2): 211-21.

30 PADULA A R. Cicatrização das feridas bucais. Monografia apresentada à Comissão do Curso de Odontologia Hospitalar, Hospital das Clínicas, 1992.

31 TAZIMA MFGS, VICENTE YAMVA, MORIYA T. Biologia da ferida e cicatrização. *Medicina (Ribeirão Preto)* 2008; 41 (3): 259-64. Tazima MFGS, Vicente YAMVA, Moriya T. Biologia da ferida e cicatrização. *Medicina (Ribeirão Preto)* 2008; 41 (3): 259-64.

32 Wasseem N.H., Lane D.P. Monoclonal antibody analysis of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA). Structural conservation and the detection of a nucleolar form. *Journal of Cell Science* 1990; 96:121-29.

33 MADEWELL BR (2001) Cellular proliferation in tumors: a review of methods, interpretation, and clinical applications. *J Vet Intern Med* 15:334–340

34 Abadie J.J., Amardeilh M.A. & Delverdier M.E. 1999. Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 in mast cell tumors from dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 215:1629-1634.

35 McMormick D, HALL PA. The complexities of proliferating cell nuclear antigen. *Histopathology*, Dec. 1992; 21(6):591-594.

36 Okuno Y., Nishimura Y. Prognostic values of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Ki67 for radiotherapy of esophageal squamous cell carcinomas. *Br J Cancer* 1999; 80(3-4):387-95.

37 LENZ, H. ;EICHLER,J. ; SCHAFFER,G. Production of a nasoantral window with argon laser. J. Maxillofac. Surg., v.22, p. 414-425, 1984.

38 Jackson SD, Lauto A. Diode-pumped fiber lasers: a new clinical Tool?. Lasers in Surgery and Medicine 2002 jun.; EUA, 30(3): 184-190.

39 MILLER, M.; TRUHE, T. *Laser in dentistry: an overview.* J. Am. Dent. Assoc. Chicago, v.124, n.2, p.32-35, Feb. 1993.

40 Varandas EC e Genovese WJ. O uso do *laser* de CO₂ em cirurgia bucal. Rev. ABO Nac.2000 abr.; 8(2): 312-317.

41 PINHEIRO, L.A., NEVES, J.C., CASTRO, J.F.L., SANTOS, Z.J., ZANIN, F.A., OLIVEIRA, A.M. Comparison of the effects of the CO₂ *laser* and clorohexidine on the descontamination of infected cutaneous wounds: a histologic study in rats. J Clin Laser Med Surg. v.20 n.3 p.123-7, 2002.

42 WILDER-SMITH P, ARRASTIA AMA, LIAW LH, BEMS. Incision properties and thermal effects of three CO₂ lasers in soft tissue. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. v.76 n.6 p.685-91, 1995.

43 Palmer SE, McGill LD. Thermal injury by in vitro incision of equine skin with electrosurgery, radiosurgery, and a carbon dioxide laser. Vet Surg 1992; 21:348-50.

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

45 LANZAFAME, R. J.; HINSHAW, R. *Laser education, laser usage, and laser surgical attitudes: a challenge for the future.* J. Clin. Laser Med. Surg., New York, v.10, n.4, p.279-281, Aug. 1992.

46 KREISLER, M. et al. Effect of diode laser irradiation on the attachment rate of periodontal ligament cells: an in vitro study. *Journal of Periodontology*, Chicago, v. 72, f. 10, p. 1312- 1317, 2001.

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

48 ROSSMANN, J. A.; GOTTLIEB, S.; KOUDELKA, B. M.; McQUADE, M. J. Effects of CO₂ laser irradiation on gingiva. *J Periodontol* , v.58, n.6, p.423-425, June. 1987.

49 FRAME, J. W. Carbon dioxide *laser* surgery for benign oral lesions. *Br. Dent. J.*, London, v.158, p.125-128, Feb. 1985.

50 Pogrel, M. A.; McCracken, K. J.; Daniels, T. E. Histologic evaluation of the width of soft tissue necrosis adjacent to CO₂ *laser* incisions. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, St. Louis, v.70, n.5, p.564-568, Nov. 1990.

51 FRAME, J. W. Recent progress with the CO₂ laser in oral surgery. *International Congress Series*, v. 1248, p.3-7, 2003.

52 LUOMANEN, M.; MEURMAN, J. H. *Laser*-induced alterations in rat oral mucosa. *Scand. J. Dent. Res.*, Copenhagen, v.94, n.5, p.452-60, Oct. 1986

53 WATANABE, I.; MORAIS, J. O. R.; GOLDENBERG, S. Estudo das alterações ultra-estruturais da mucosa lingual de ratos incisada com raio *laser* de CO₂. *Acta Cir. Bras.*, São Paulo, v.4, n.2, p.74-80, 1989

54 GOMES, P.O.; WATANABE, I.; MATERA, A.; LOPES, R. A.; GOLDENBERG, A. Efeitos do raio *laser* CO₂ no pâncreas de cães: estudo à micros. eletrônica de varredura. *Acta Cir. Bras.*, São Paulo, v.5, n.2, p.59-65, 1990.

55 DUARTE, C. A.; NAKAE, K.; GOLDENBERG, S.; ARAUJO, N. .; LASCALA, N. T. Estudo dos efeitos biológicos do raio *laser* CO₂ sobre tecidos gengivais de ratos. Rev. Paul. Odontol., São Paulo, n.5, p.50-55, set./out.1984.

56 FISHER, S. E.; FRAME, J. W.; BROWNE, R. M. et al. A comparative histological study of wound healing following CO₂ laser and conventional surgical excision of canine buccal mucosa. Arch Oral Biol, v.28, n.4, p.287-291, 1983.

57 Chomette G, Auriol M, Labrousse F, Vaillant JM. Influence du rayonnement laser CO₂ sur les modalités morphologiques de la cicatrisation cutanéomuqueuse en chirurgie stomatologique (Influence of CO₂ laser radiation on morphological changes in cutaneo-mucous cicatrization in stomatologic surgery, Fr.) Rev. Stomatol. Chir. Maxillofac.,1991; 92(1): 1-7.

58 Raldi FV, Niccolli Filho W, Santos, LM. Estudo comparativo entre cirurgia convencional e a laser de dióxido de carbono (CO₂) na orientação da reparação do nervo facial. Estudo histológico em ratos. Rev Fac Odon. Bauru 2002; 10(2):105-11.

59 PICK, R. M.; PECARO, B. C. Use of the CO₂ *laser* in soft tissue dental surgery. *Lasers Surg Med.*, New York, v.7, n.2, p.207-213, 1987.

60 PAT HYLTON, R. Use of CO₂ laser for gingivectomy in a patient with Sturge-Weber disease complicated by dilantin hiperplasia. J Oral Maxillofac Surg, 44:646-8, 1986.

61 BARAK, S.; KAPLAN, I. The CO₂ *laser* in the excision of gingival hyperplasia caused by nifedepine. J. Clin. Periodontol., Copenhagen, v.15, n.10, p.633- 635, Nov. 1988.

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

63 WATANABE, I.; LOPES, R. A.; LIBERTI, E. A.; AZEREDO, R. A.; TAKAKURA, C. F. H.; GOLDENBERG, S. Estudo ao microscópio óptico e eletrônico de transmissão na cicatrização de feridas produzidas pelo *laser* de CO₂ no palato do rato. Acta Cir.. Bras., São Paulo, v.2, n.4, p.108-112, 1987.

64 EVRARD, L.; NAMMOUR, S.; DOUROV, N. Scanning eletron microscopic and immunocytochemical studies of contraction during secondary CO₂ *laser* wound healing in rat tongue mucosa. J. Oral Pathol. Med., Copenhagen, v.25, n.2, p.72-77, Feb.1996.

65 CENTTY, I. G.; BLANK, L. W.; LEVY, B. A.; ROMBERG, E.; BARNES, D. Carbon dioxide laser for de-epithelization of periodontal flaps. J. Periodontol., Chicago, v.68, n.8, p.763-769, Aug. 1997

66 Salgado CM, Vieira EM, Blachman, IT. Aplicações do laser CO₂ em lesões bucais do tecido mole. Rev. Odontol. UNICID 2000 jan.- jun.; 12(1): 55-63.

67 ROED-PETERSEN, B. The potential use of CO₂ laser gingivectomy for phenytoin-induced gingival hyperplasia in mentally retarded patients J clin Periodontol, 20: 729-31, 1993.

68 GARCIA, V. G.; THEODORO, L. H. Gengivoplastia com *laser* CO₂. Rev. Fac. Odontol. Lins, Lins, v.11, n.1, p. 38-41, jan./jun. 1998.

69 PATROCINIO, M. C.; NICCOLI-FILHO, W. Effects of carbon dioxide *laser* (CO₂) 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.

70 Y, I. G.; BLANK, L. W.; LEVY, B. A.; ROMBERG, E.; BARNES, D. Carbon dioxide *laser* for de-epithelization of periodontal flaps. J. Periodontol., Chicago, v.68, n.8, p.763-769, Aug. 1997.

73 PAES-JÚNIOR T. A. NICCOLI-FILHO W. Clinical comparison 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.

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

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

76 ROMANOS, G. E, KARMAN, M. A., NENTWIG, G. H. Clinical experince with a diode laser in oral surgical procedures. Frankfut: Dental School Frankfurt, 1998.

77 Adams TC e Pang PK. lasers in aesthetic dentistry. *The Dental Clinics of North America* 2004 jan.; EUA, 48(4): 833-860.

78 Holweg A. The vision MDL-diode laser in the daily intra oral application. Fulda, Germany: Fulda; 2004.

79 Reichwage DP, Barjenbruch T, Lemberg K, Janiszewski T, Marr D. Esthetic contemporary dentistry and soft tissue recontouring with diode laser. *J Indiana Dent Assoc* 2004, EUA, 83(1): 13-15.

80 Hilgers JJ, Tracey SG. Clinical uses of diode lasers in orthodontics. *J. Clin.Orthod.* 2004 maio, EUA, 38(5): 266-273

81 AZEVEDO, L. H. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor. www.teses.usp.br/teses 2005.

82 Werneck CE, Pinheiro ALB, Pacheco MTT, Soares CP, Castro JFL. Laser light is capable of inducing proliferation of carcinoma cells in culture: A spectroscopic in vitro study. *Photomedicine and Laser Surgery* 2005; 23 (3): 300-303.

83 RIZOIU, I. M.; EVERSOLE, L. R.; KIMMEL, A. Effects of an Erbium, Chromium, Yttrium, Scandium, Gallium, Garnet laser on mucocutaneous soft tissue. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, St. Louis, v.82, n.4, p.386-395, Oct. 1996

84 Ishii J, Kuriyama T, Komori T. Experimental study on the morphological and functional recovery following partial glossectomy in rabbits: a comparison between CO₂ laser and electrocautery. *Photomedicine and Laser Surgery* 2005 fev.; EUA, 23(1): 47-51.

85 Newman J, Anand V. Applications of the diode laser in otolaryngology. *Ear Nose Throat J.* 2002 Dec;81(12):850-1.

86 Goharkhay K, Moritz A, Wilder-Smith P, Schoop U, Kluger W, Jakolitsch S, Sperr W: Effects on oral soft tissue produced by a diode laser in vitro. *Lasers Surg Med* 1999; 25 : 401–6.

87 Taylor DL, Schafer SA, Nordquist R, Payton ME, Dickey DT, Bartels KE. Comparison of a high power diode laser with the Nd:YAG laser using in situ wound strength analysis of healing cutaneous incisions. *Lasers In Surgery and Medicine* 1997 jan.; EUA, 21(3): 248-254.

ANEXOS