

Adriana de Azevedo Coutinho Mariuzzo

***ESTUDO HISTOLÓGICO COMPARATIVO DA
REPARAÇÃO DE LESÕES PROVOCADAS EM
MÚSCULO ESTRIADO DE RATO PELO LASER DE
CO₂ APLICADO EM CONDIÇÕES DE ENERGIA
CONSTANTE VARIANDO TEMPO E POTÊNCIA***

*Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em
Neurociências da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em:
NEUROCIÊNCIAS*

Orientador: Prof.^a Dr.^a Ester M. Danielli Nicola

Co-orientador: Prof. Dr. Konradim Metze

Campinas

1997

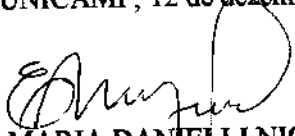


BC
MADA:
Ex.
BC/ 3213
30/9/98
D ☒
24/11/98
2-10/98

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação em Neurologia/Neurociências da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Neurociências pela Médica ADRIANA AZEVEDO COUTINHO MARIUZZO.

CPGN/FCM/UNICAMP, 12 de dezembro de 1997

00105120-0


ESTER MARIA DANIELLI NICOLA
 Orientadora (mat. 08901-2)

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
 BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
 UNICAMP**

M339e

Mariuzzo, Adriana de Azevedo Coutinho

Estudo histológico comparativo da reparação de lesões provocadas em músculo estriado de rato pelo laser de CO2 aplicado em condições de energia constante variando tempo e potência / Adriana de Azevedo Coutinho Mariuzzo. Campinas, SP : [s.n.], 1997.

Orientadores : Ester Maria Danielli Nicola, Konradim Metze
 Tese (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Laser de dióxido de carbono. 2. Histologia. 3. * Reparo tecidual. I. Ester Maria Danielli Nicola. II. Konradim Metze. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

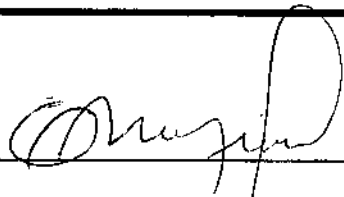
BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ORIENTAÇÃO: Prof. ^a Dr. ^a. Ester M. Danielli Nicola

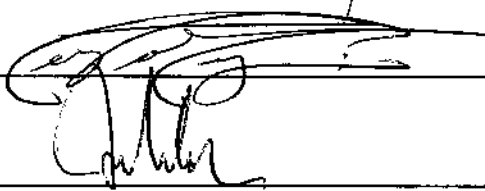
CO-ORIENTAÇÃO: Prof. Dr. Konradim Metze

MEMBROS:

1.



2.



3.

**Curso de Pós-Graduação em Neurociências - Faculdade de Ciências Médicas -
Universidade Estadual de Campinas**

DATA: 12/12/97

*A meus pais, Helena e Caetano,
que me deram a vida, o amor, o exemplo de trabalho e o
constante incentivo para minha realização pessoal e
profissional*

*A João Batista, meu marido,
pelo amor, pela paciência e apoio sempre otimista,
encorajando-me a seguir adiante.*

*A minha irmã, Heliana, que me
estimula a ir sempre além, mostrando com seu exemplo que
é possível sonhar e lutar para realizar os sonhos*

*A Dr.^a. Ester, minha orientadora
e amiga por sua dedicação, norteando meu crescimento
acadêmico e pessoal.*

*Ao Dr. Konradin pelo amizade,
orientação e empenho na realização deste trabalho.*

AGRADECIMENTOS

Ao longo de toda nossa vida recebemos e reconhecemos muito a amizade, apoio e colaboração das pessoas que contribuíram para realizarmos sonhos e atingirmos metas.

À José Roberto Franchi Amade que acreditou em meu potencial e favoreceu meu crescimento profissional e pessoal, abrindo-me muitos caminhos e demonstrando sempre valorosa amizade e carinho.

Ao incentivo e amizade de Reinaldo Jordão Gusmão.

Ao professor Jorge Humberto Nicola pela amizade e orientação em muitos aspectos e principalmente nos conceitos físicos.

À amiga Maria Aparecida Baroni, pelo apoio e inestimável contribuição para este trabalho.

Ao Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental da F. C. M. - UNICAMP em especial ao Laboratório Laser que possibilitaram o desenvolvimento do nosso trabalho.

À ajuda inestimável dos amigos Maria, Milton e William na realização deste trabalho.

Ao Laboratório de Anatomia Patológica Experimental do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental da F. C. M. - UNICAMP, nas pessoas de Gisela, Ismael e Luzia, pelo excelente trabalho realizado na manufatura das lâminas.

Ao Setor de Apoio Didático e Científico pelo trabalho cuidadoso e de excelente qualidade na correção, arranjo e ilustração da tese, realizados por Sr. ^aMaise, Sr. Emilton, Sr. Marcos e Renata.

Ao tio Ivan Molica Villela pelo empréstimo de seu estimado microscópio que facilitou imensamente nosso trabalho.

Ao apoio dos amigos Diva Helena Baldin, Gema, Wagner e Ivanilde, da Unidade de Medicina Laser do Hospital das Clínicas da UNICAMP.

À Ana Adélia, Secretária do Departamento de Neurociências, pela pronta colaboração para solucionar dificuldades no andamento de nosso trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	i
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Laser	2
1.2. Tecido muscular estriado.....	13
1.3. Reparação tecidual.	16
1.4. Reparo do tecido muscular estriado.....	20
1.5. Reparo tecidual após utilização do laser CO2.....	22
2. OBJETIVO.....	24
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	26
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	34
4.1. Equipamento.....	35
4.2. Animal de experimentação.....	38
4.3. Métodos.....	39
5. RESULTADOS.....	45
6. DISCUSSÃO.....	64
7. CONCLUSÃO.....	75
8. SUMMARY.....	77
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79
10. ANEXO.....	89

LISTA DE FIGURAS, TABELAS, FOTOS E GRÁFICOS

Figuras

Figura 1 – Emissão Espontânea de Radiação..... 3

Figura 2 – Emissão Estimulada de Radiação 4

Figura 3 – Ação construtiva de dois fótons resultando em um “pacote” com intensidade maior..... 5

Figura 4 – Interação da luz laser com tecido biológico..... 7

Figura 5 – Espectro eletromagnético ressaltando o comprimento de onda dos lasers mais utilizado na Medicina..... 8

Figura 6 – Focalização do feixe laser..... 10

Figura 7 – Formato tridimensional de lesão resultante da ação do raio laser no tecido biológico..... 11

Figura 8 – Representação esquemática das divisões do tecido conjuntivo que envolve o músculo estriado..... 15

Figura 9 – Parâmetros morfológicos na lesão imediata..... 43

Figura 10 – Parâmetro morfológico analisado nas lesões em reparação..... 44

Tabelas

Tabela 1 – Efeitos fototérmicos e danos da interação de laser com tecido biológico.....	12
Tabela 2 – Teste Friedman	60

Fotos

Foto 1 – Arquitetura do tecido muscular estriado.....	14
Foto 2 – Laser CO2 TL 1030, nacional com braço articulado, caneta bisturi e anel posicionador metálico.....	36
Foto 3 – Laser CO2 “powermeter”.....	37
Foto 4 – Fragmento acrílico, com pontos de laser reproduzindo o formato das lesões	38
Foto 5 – Pele da região dorsal rebatida e exposição dos músculos <i>glúteos maximus</i>	40
Foto 6 – Exposição do músculo direito onde foram aplicados pontos de laser CO2 e músculo esquerdo, deixado como controle. Interposição de fragmento plástico.....	41
Foto 7 – Aspecto microscópico da lesão de BP x LT imediatamente após a aplicação do laser de CO2 (5.0W x 2,0s), com Objetiva –1,6.....	48
Foto 8 – Aspecto microscópico da lesão de BP x LT após 1 dia da aplicação do laser de CO2 (5.0W x 2,0s), com Objetiva –1,6.....	49
Foto 9 – Aspecto microscópico da lesão de BP x LT 4 dias após da aplicação do laser de CO2 (5.0W x 2,0s), com Objetiva –1,6.....	50
Foto 10 – Aspecto microscópico da lesão de BP x LT 7 dias após da aplicação do laser de CO2 (5.0W x 2,0s), com Objetiva –1,6.....	51
Foto 11 – Aspecto microscópico da lesão de BP x LT 15 dias após da aplicação do laser de CO2 (5.0W x 2,0s), com Objetiva –1,6.....	52
Foto 12 – Aspecto microscópico da lesão de BP x LT 21 dias após da aplicação do laser de CO2 (5.0W x 2,0s), com Objetiva –1,6.....	53
Foto 13 – Aspecto microscópico da lesão de AP x CT imediatamente após da aplicação do laser de CO2 (20W x 0,5s), com Objetiva –1,6.....	54

Foto 14 – Aspecto da lesão de AP x LT 1 dia após a aplicação do laser de CO2 (20W x 0,5s), com Objetiva –1,6.....	55
Foto 15 – Aspecto da lesão de AP x CT 4 dias após a aplicação do laser de CO2 (20W x 0,5s), com Objetiva –1,6.....	56
Foto 16 – Aspecto da lesão de AP x LT 7 dias após a aplicação do laser de CO2 (20W x 0,5s), com Objetiva –1,6.....	57
Foto 17 – Aspecto da lesão de AP x CT 15 dias após a aplicação do laser de CO2 (20W x 0,5s), com Objetiva –1,6.....	58
Foto 18 – Aspecto da lesão de AP x CT 21 dias após a aplicação do laser de CO2 (20W x 0,5s), com Objetiva –1,6.....	59
Foto 19 – Lesão disforme ocasionada pelo deslizamento entre os fascículos musculares durante a utilização do laser CO2.....	66
Foto 20 – Lesão uniforme provocada pelo laser de CO2 em pele de porco.....	67
Foto 21a – Aspecto microscópico da regeneração muscular com AP x CT com 15 dias após a aplicação do laser CO2 (20W x 0,5s) com Objetiva – 20.....	71
Foto 21b - Aspecto microscópico da regeneração muscular com BP x CT com 21 dias após a aplicação do laser CO2 (05W x 2,0s) com Objetiva – 20	72
Foto 22a - Aspecto microscópico da regeneração muscular com AP x CT com 21 dias após a aplicação do laser CO2 (20W x 0,5s) com Objetiva – 20.....	73
Foto 22b - Aspecto microscópico da regeneração muscular com BP x CT com 21 dias após a aplicação do laser CO2 (05W x 2,0s) com Objetiva – 20	74
Foto 23 – Aplicação do laser CO2 em pele de rato.....	90

Gráficos

Gráfico 1 – Profundidade da cratera medida em mm ao longo dos dias, durante a reparação tecidual..... 61

Gráfico 2 – Profundidade total da lesão medida em mm ao longo dos dias, durante a o reparo tecidual..... 62

Gráfico 3 – Tecido de regeneração medido em mm ao longo dos dias durante o reparo tecidual..... 63

Resumo

O presente trabalho mostra alguns aspectos da interação do laser¹ com o tecido. As propriedades físicas do laser são relatadas com o objetivo de explicar a razão dos seus diversos modos de atuar sobre os diferentes tecidos.

O dano tecidual depende de vários parâmetros físicos e biológicos, como: potência, tempo de exposição ao laser, distância focal, diâmetro do raio e tipo de tecido.

O laser de CO₂, escolhido para realização deste trabalho, atua como um “bisturi cirúrgico” através da grande eficiência na conversão de sua radiação infravermelha em calor localizado. Tal característica faz com que seja, ainda, o mais utilizado na área médica, principalmente nas cirurgias.

Neste estudo são revistas e discutidas diversas características do tecido muscular estriado, no sentido de explicar as peculiaridades das lesões conseqüentes à aplicação do laser CO₂.

Dependendo da forma como os parâmetros do laser forem combinados, os efeitos podem variar, desde cortes profundos até cauterização. Foi demonstrado que ao serem utilizadas potências e tempos diferentes, mesmo mantendo constante energia total em uma dada área de tecido, as lesões causadas apresentam-se morfologicamente diferentes.

Os diferentes conjuntos de lesões resultantes da utilização do laser nas condições acima mencionadas foram analisados morfometricamente, sob microscopia óptica, imediatamente à aplicação, bem como após 1, 4, 7, 15 e 21 dias.

As alterações histológicas foram avaliadas e discutidas do ponto de vista quantitativo e qualitativo. Comparando o processo de reparação tecidual dos dois conjuntos extremos, constatamos diferenças significativas que permitiram considerar que a reparação de lesões causadas em condições de alta potência e curto tempo evolui de forma mais avançada, superando aquela das lesões conseqüentes à aplicação de baixa potência e longo tempo.

1- Laser - siglema oriundo da expressão inglesa light amplification by stimulated emission of radiation (l - a - s - e - r). Neste trabalho, inclusive no título, usamos a forma laser; também utilizada no plural, lasers, e em composição, laser-tecido, seguindo o que se encontra comumente na literatura científica, como se fosse palavra da língua portuguesa.

1. INTRODUÇÃO

1.1. LASER

Laser é luz. Este é um conceito muito importante quando se pensa utilizá-lo como instrumento em qualquer tipo de situação. Para que se possa utilizar uma nova tecnologia, é preciso conhecer muito bem suas características a fim de otimizar suas vantagens e minimizar seus efeitos indesejáveis. É imprescindível o conhecimento de alguns conceitos físicos básicos acerca do laser, bem como sua interação com o tecido biológico. Um maior entrosamento entre ciências médicas e exatas é possível graças ao conhecimento de ambas e de suas interfaces. Muito proveito tem-se tirado da adequação de instrumentos desenvolvidos em laboratórios e adaptados às necessidades médicas. Todos ganham com essa interação que possibilita sua aplicação prática.

Laser é forma que se origina de “Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation” (*Luz Amplificada por Emissão Estimulada de Radiação*), segundo EISBERG & RESNICK (1979).

Para se obter luz laser é fundamental a presença de um meio ativo e uma fonte excitadora, podendo esta ser corrente elétrica, luz ou calor. O meio ativo pode ser sólido, líquido ou gasoso, onde os átomos tenham a capacidade de ser excitados a um nível elevado de energia. Será tomado como exemplo o modelo atômico de Bohr, para demonstração do que ocorre com o átomo neste meio ativo (OSSOFF, GONZALEZ, WERKHAVEN, 1986).

O átomo é composto por um núcleo em torno do qual estão os elétrons, nos respectivos orbitais. Cada orbital apresenta um nível de energia que é maior à medida que se afasta do núcleo. Quando um elétron é excitado por determinado estímulo, adquire energia e se desloca para um orbital energeticamente superior, tornando-se então mais instável. Esta instabilidade faz com que ele retorne espontaneamente ao seu orbital de origem, liberando energia sob a forma de fóton. Este é o fenômeno da Emissão Espontânea de Radiação (figura 1).

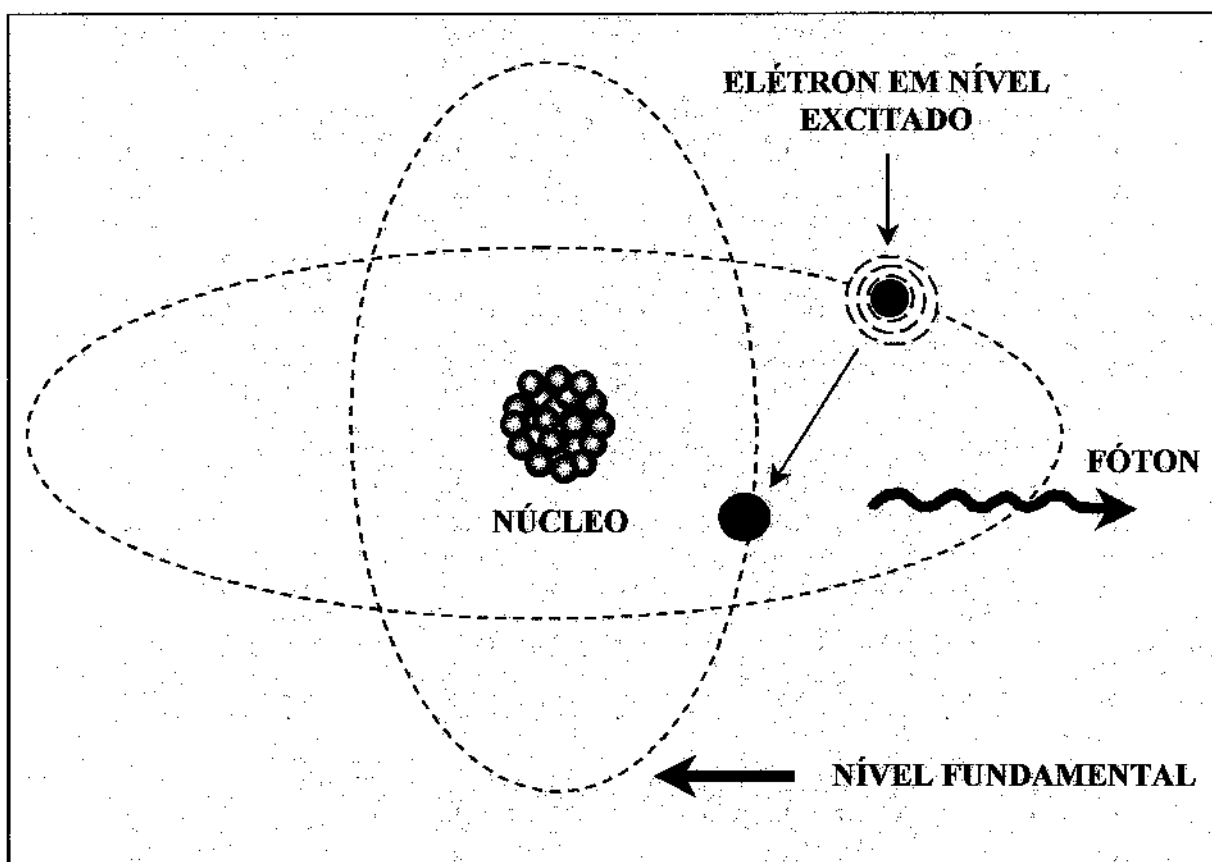


figura 1: Emissão Espontânea de Radiação

Na Emissão Estimulada de Radiação, um fóton estimulador incide em um átomo ou molécula previamente excitada e determina que retorne ao estado de menos energia, emitindo um novo fóton estimulado, com a mesma frequência que o fóton incidente estimulador (figura 2).

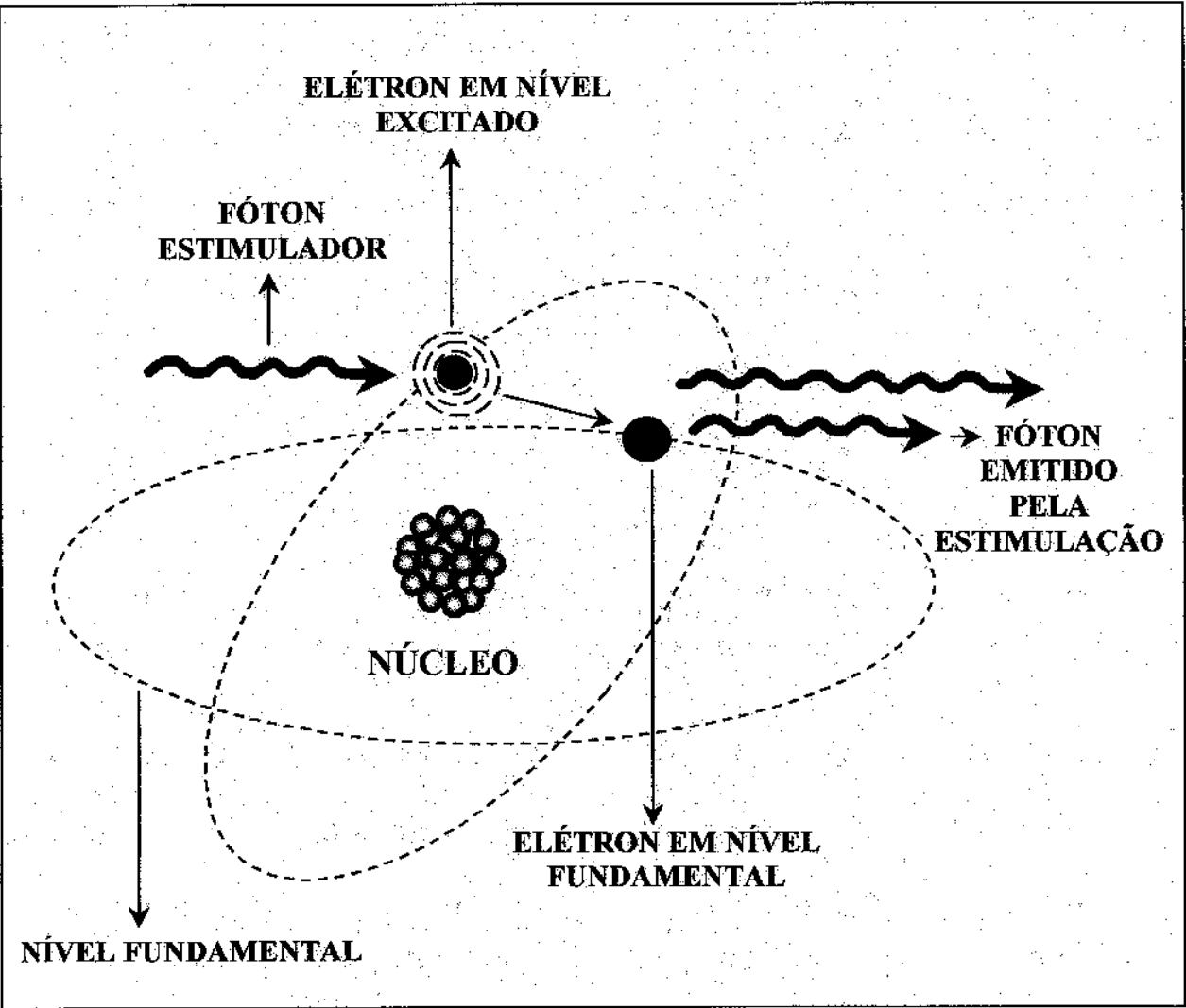


figura 2 : Emissão Estimulada de Radiação

Os dois fótons (estimulador e estimulado) propagam-se na mesma direção e com a mesma fase. Assim, a sua interferência é construtiva, resultando em um “pacote” de dois fótons com intensidade maior , como mostra a figura 3.

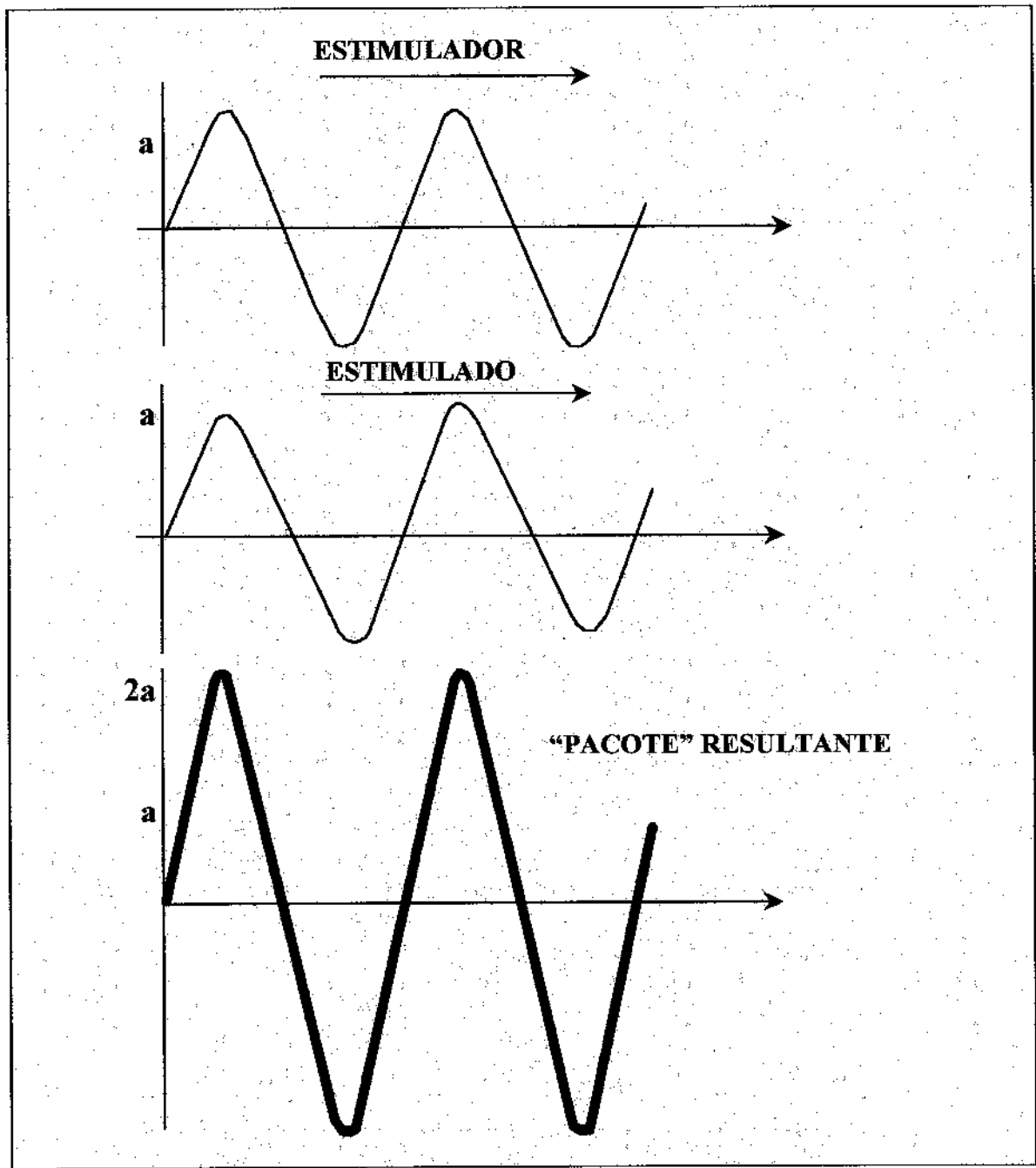


figura 3: Ação construtiva de dois fótons resultando em um “pacote” com intensidade maior.

A soma de dois fótons considerados acima (pacote) pode estimular novo processo, resultando sempre em outro “pacote”, de mais alta intensidade. O raio laser é basicamente o resultado da repetição deste processo por um grande número de vezes.

No sistema laser, o gás, elemento ativo, é confinado num recipiente, um tubo por exemplo, e energia constante é fornecida através da fonte ativadora, mantendo os elétrons continuamente excitados. Para realimentar o sistema e aumentar a quantidade de fótons de energia do laser, são colocados dois espelhos, um em cada extremidade da câmara, dos quais um totalmente e outro parcialmente refletor. Este recurso aumenta a chance de um fóton colidir com um elétron ativado, pois quando encontram o espelho são devolvidos ao meio, ampliando a emissão estimulada através do direcionamento dos fótons. Ocorre um aumento na população de fótons e então um somatório de energia se transmite através do espelho parcialmente refletor, na forma de um feixe de luz laser (POLANYI, 1983).

Por todos esses recursos utilizados, o laser é luz com algumas características próprias, que a tornam especial, e tem como propriedades físicas particulares a monocromaticidade, coerência e colimação.

A monocromaticidade deve-se ao fato de que, em cada laser, o elemento ativo é sempre o mesmo e emite um determinado comprimento de onda no espectro eletromagnético, determinando, portanto, cor única.

Coerência é determinada pela manutenção da mesma relação de espaço e tempo entre os raios cujos fótons encontram-se em fase vibracional coincidente (ondas viajam em fase entre si), de acordo com a figura 3.

Colimação é determinada pelo paralelismo dos raios emitidos pelo feixe de luz laser.

As três características acima fazem com que a luz laser seja mais intensa que a luz comum.

A interação de laser com tecido depende das propriedades ópticas teciduais (McKENZIE, 1990). A radiação laser apresenta as propriedades de luz e, ao incidir na superfície tecidual, sofre reflexão, absorção e transmissão (figura 4).

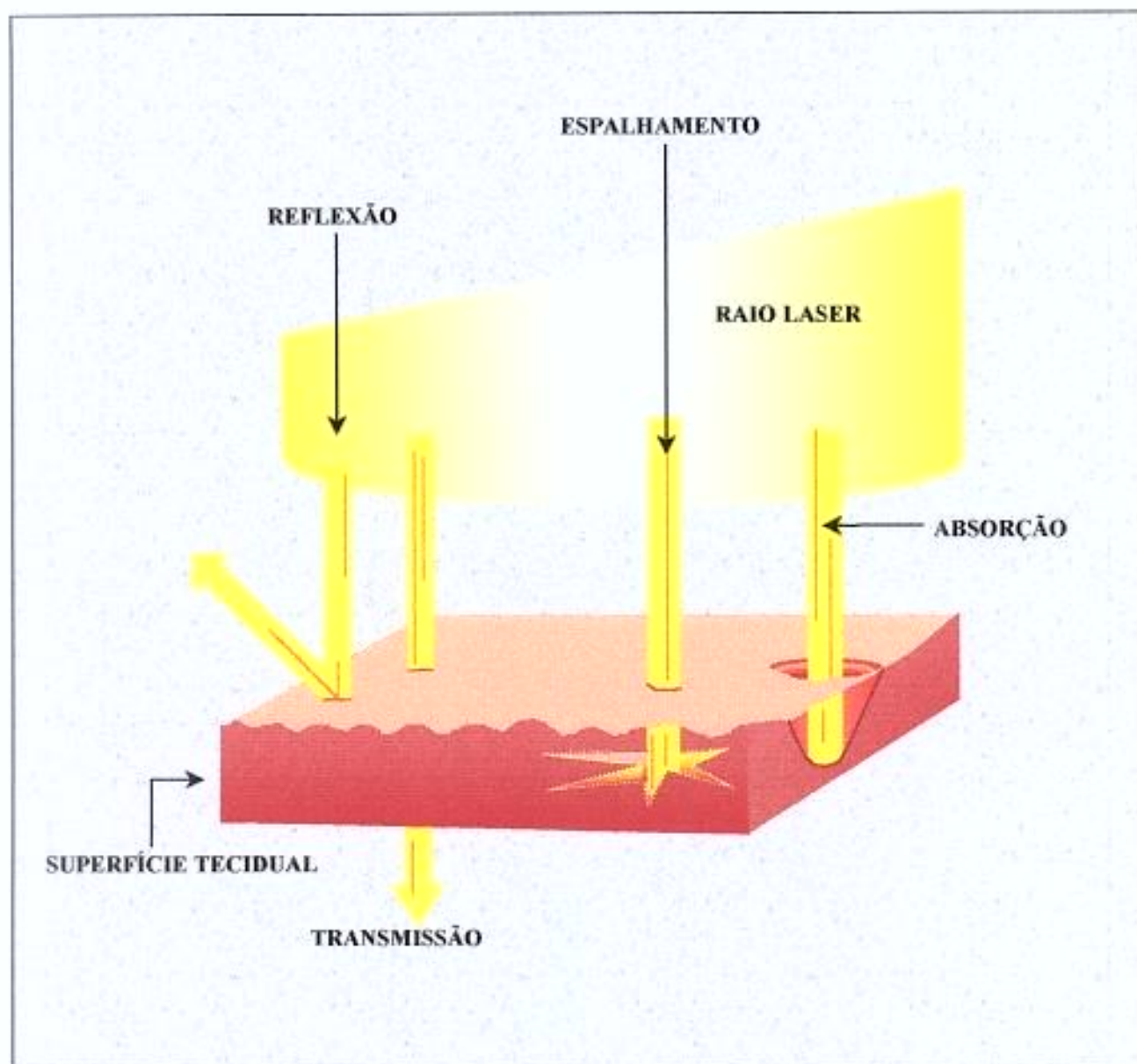


figura 4: Interação da luz laser com tecido biológico.

A proporção entre o quanto é absorvido, refletido e transmitido depende do tipo de tecido trabalhado e do comprimento de onda do laser utilizado.

A reflexão que ocorre quando o laser incide na superfície do tecido determina uma dissipação de energia e, conseqüentemente, uma perda na energia final fornecida ao tecido.

Transmissão é a capacidade de penetração da luz laser no tecido biológico sem que haja interação com os componentes do mesmo.

Os lasers que emitem raios na faixa visível do espectro eletromagnético transmitem-se bem, ao longo do tecido, e atingem camadas mais profundas.

Absorção é a capacidade da luz laser de interagir com o tecido biológico, modificando-o. A energia luminosa, quando reage com o tecido, é convertida em outra forma energética que pode ser ou não térmica. O tecido não é uma substância homogênea pela presença de pigmentos, vascularização, hidratação. A absorção tecidual depende desses componentes e das múltiplas reflexões internas resultantes do espalhamento causado pela falta de homogeneidade do meio (POLANYI, 1983).

O laser de luz visível apresenta maior afinidade com pigmentos como melanina, hemoglobina, presentes no tecido e transmite-se bem, através dos tecidos não-pigmentados, embora se aprofunde mais nos pigmentados. O laser que se encontra na região do infravermelho, no espectro eletromagnético, transmite-se pouco, sendo muito absorvido pelos tecidos, independentemente da presença de pigmentos e causa efeito térmico importante (JACQUES, 1992), conforme se observa na figura 5.

ESPECTRO DA RADIAÇÃO ELETRO MAGNÉTICA

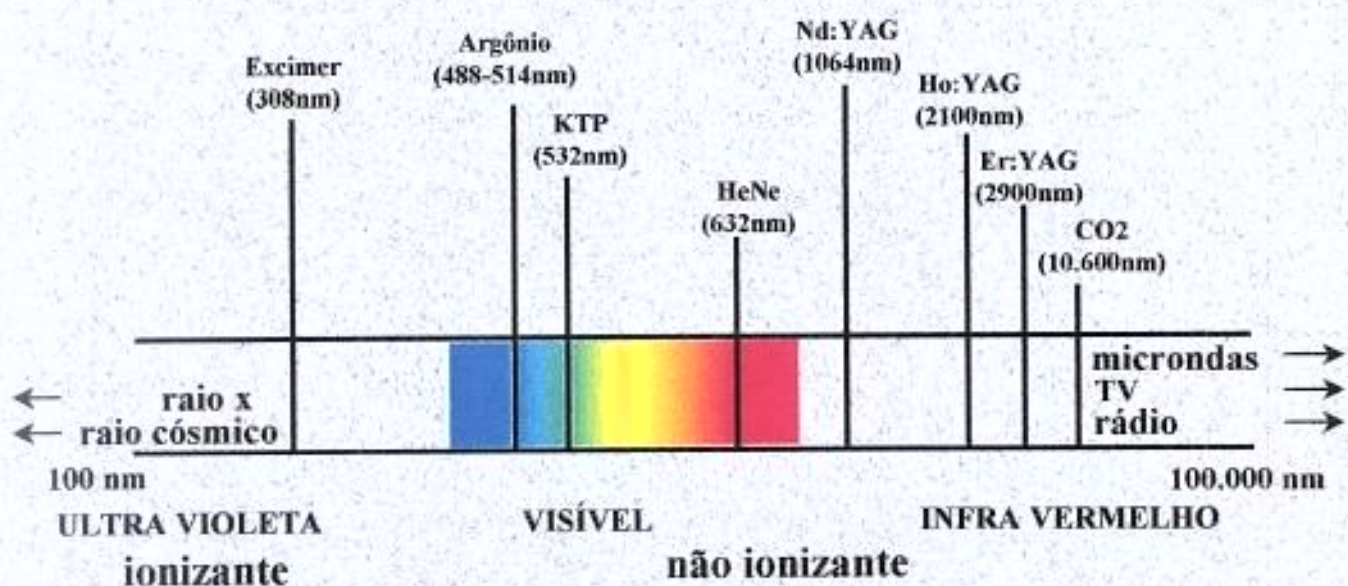


figura 5: Espectro eletromagnético ressaltando o comprimento de onda dos lasers mais utilizados na Medicina.

O laser vem sendo aplicado na Medicina desde a década de 60. Desde aquela época foram desenvolvidos muitos tipos de laser, a partir de gás, cristais e corantes, voltados para utilização médica. Existe uma grande variedade de laser cujas particularidades devem ser conhecidas, bem como sua interação com os diferentes tecidos, para que a escolha seja a mais adequada ao local e forma de aplicação.

O laser de CO₂ foi escolhido para nosso trabalho, pois ainda hoje é um dos mais utilizados na Medicina. Seu comprimento de onda é 10,6µm, atua na forma de calor e é muito bem absorvido pela água, que representa 80% da composição do tecido biológico. Graças às propriedades físicas, seu raio pode ser focado em um ponto muito pequeno com uma grande concentração de energia, capaz de determinar efeito térmico importante (JAIN, 1983). A focalização do raio depende da lente utilizada e da distância em que ela se encontra da fonte. O alto grau de coerência e colimação dos raios emitidos, quando estes atravessam uma lente convergente, determina um foco mínimo, cujo limite teórico é o comprimento de onda do laser. O foco é o ponto ideal para trabalhar, quando se deseja obter o efeito máximo do laser, pois é onde se concentra a maior densidade de potência.

Para compreensão do funcionamento do laser e sua interação com os tecidos é fundamental o conceito de densidade de potência.

A energia é sempre convertida de uma forma para outra e muitas vezes reversível, como de energia óptica para térmica.

$$\text{Potência} = \frac{\text{energia}}{\text{tempo}}$$

A área onde se aplica a energia é um parâmetro tão importante quanto o tempo e deve, portanto, ser considerada.

Densidade de potência é a potência pela área onde se dá a interação de energia com um sistema (FISHER, 1983).

$$\text{Densidade de potência} = \frac{\text{potência}}{\text{área}}$$

A área vai depender do tamanho do feixe de raios que incide no tecido. O raio laser emitido da fonte apresenta feixes paralelos que são concentrados por uma lente, formando uma cintura cujo diâmetro mínimo é o foco do laser, onde a concentração de energia é maior. Ultrapassando esse foco, os feixes se abrem e voltam a apresentar o diâmetro anterior, com maior tamanho e menos energia, desfocado (NICOLA, 1984; OSSOFF *et al.*, 1986), conforme figura 6.

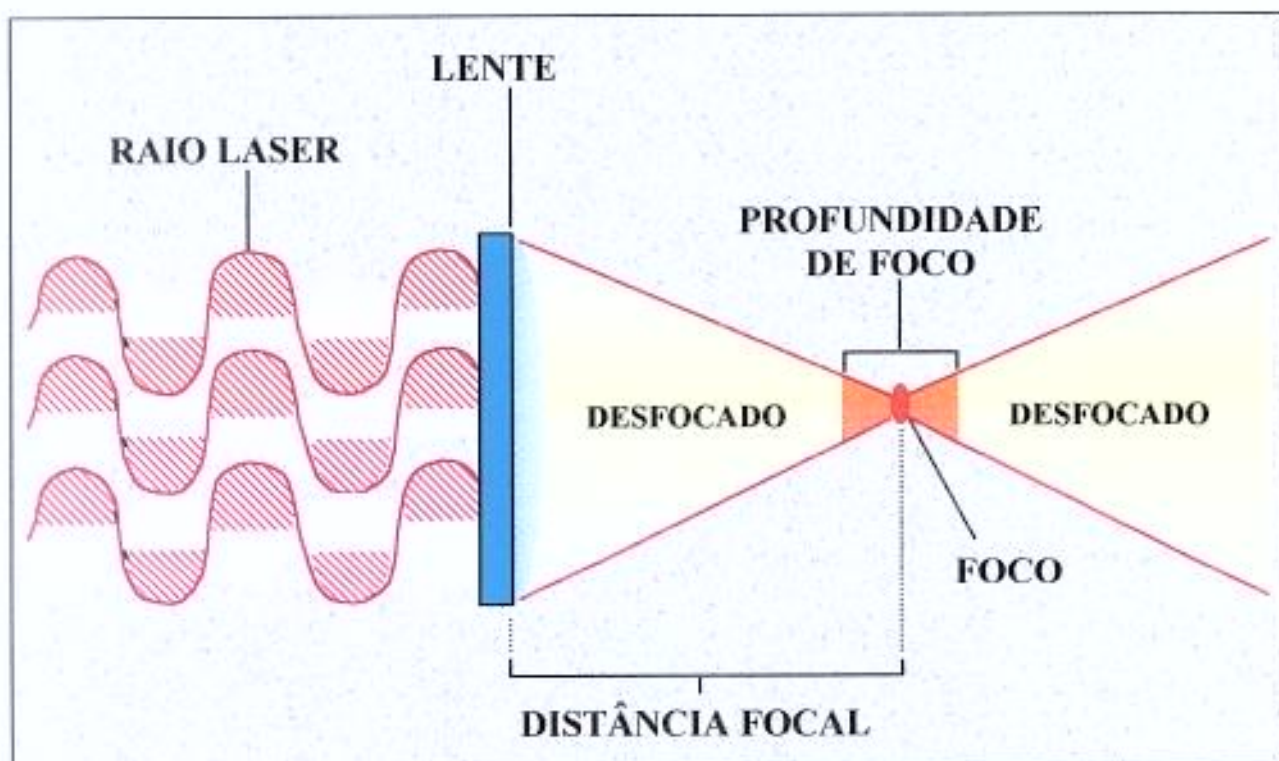


figura 6: Focalização do feixe laser

A densidade de potência média por área vai depender do perímetro do raio e, na realidade, não é uniforme em todos os pontos deste. O contorno da superfície da densidade de potência é influenciado pela variação do campo eletromagnético perpendicular ao longo eixo da cavidade laser.

A expressão modo eletromagnético transversal (TEM) é usada para descrever o contorno do raio em função das variações do campo eletromagnético. O modo é denominado TEM_{nm}, onde *m* é o número de áreas sem energia no eixo horizontal e *n*, no eixo vertical. No modo TEM₀₀ a força é concentrada e uniformemente distribuída no

centro do ponto. Este é o modo utilizado por muitos lasers, onde o eixo central apresenta maior energia, forma lesões cujo centro é a região mais profundamente atingida (OSSOFF *et al.*, 1986; PARTOVI *et al.*, 1987), e foi o que empregamos em nosso trabalho.

Podemos utilizar uma figura tridimensional para demonstrar o formato da superfície de densidade de potência com o TEM00, que é denominado modo fundamental (FISHER, 1983), como vemos na figura 7.

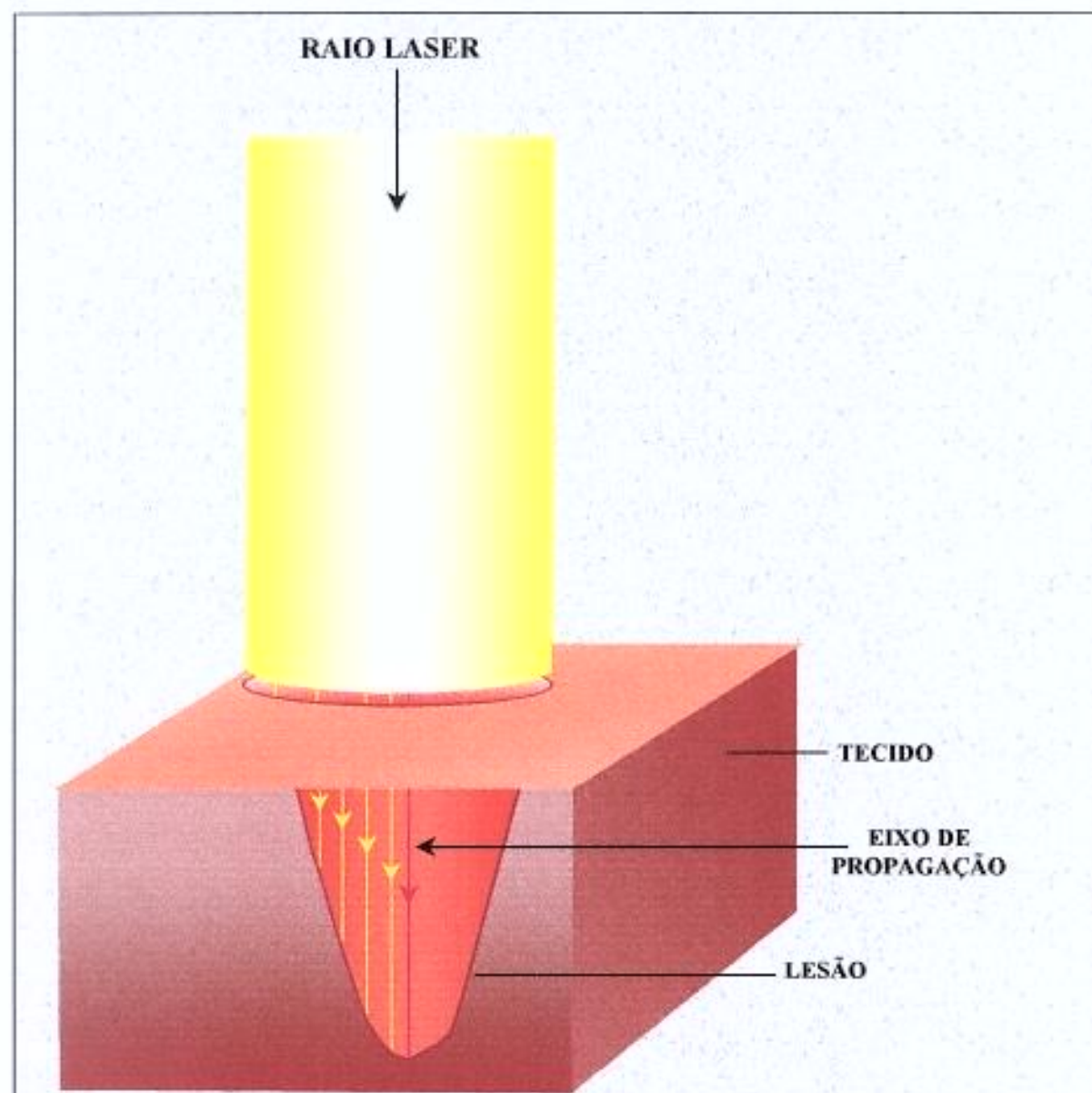


figura 7: Formato tridimensional de lesão resultante da ação do raio laser no tecido biológico.

deste tipo de fibra muscular e justifica o nome de músculo estriado (HAM & CORMAK, 1983), visto na foto 1.

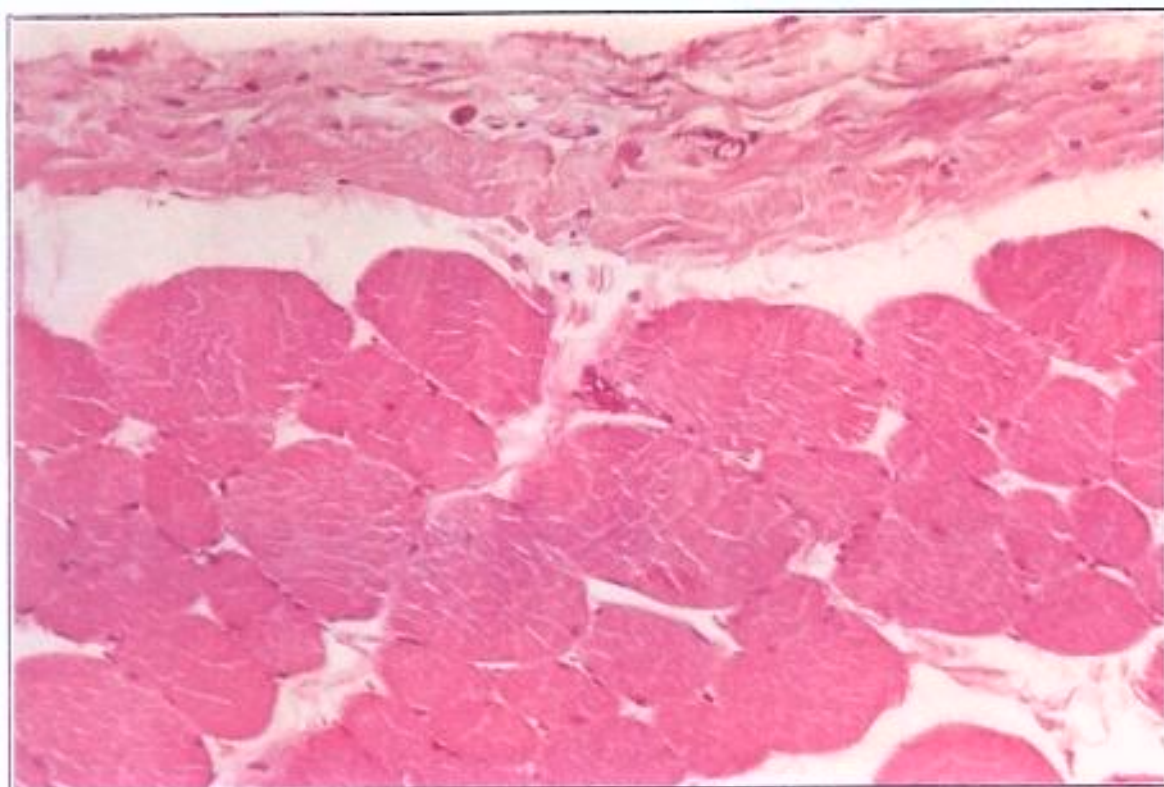


foto 1: Arquitetura do tecido muscular estriado

Cada fibra muscular estriada é envolta por uma membrana fina chamada sarcolema, que possui grande permeabilidade e propriedades elétricas. Quando um impulso nervoso chega à terminação nervosa motora da fibra, esta se contrai, devido a uma onda de despolarização que percorre o sarcolema. O responsável pela difusão do impulso, da superfície para o interior, é o retículo sarcoplásmico, que funciona de maneira semelhante à membrana celular e fornece meios para que a onda de despolarização atinja todo o sarcômero.

O músculo é envolvido, como um todo, por uma camada de tecido conjuntivo denominada epimísio, em cujo interior aparecem outras camadas do mesmo tecido, chamadas perimísio, partindo do epimísio e organizando a massa muscular em vários feixes. O endomísio é um tecido conjuntivo muito delicado, que se estende do perimísio até

o interior de cada feixe, envolvendo todas as fibras (MASTAGLIA & WALTON, 1982), como pode ser visto na figura 8.

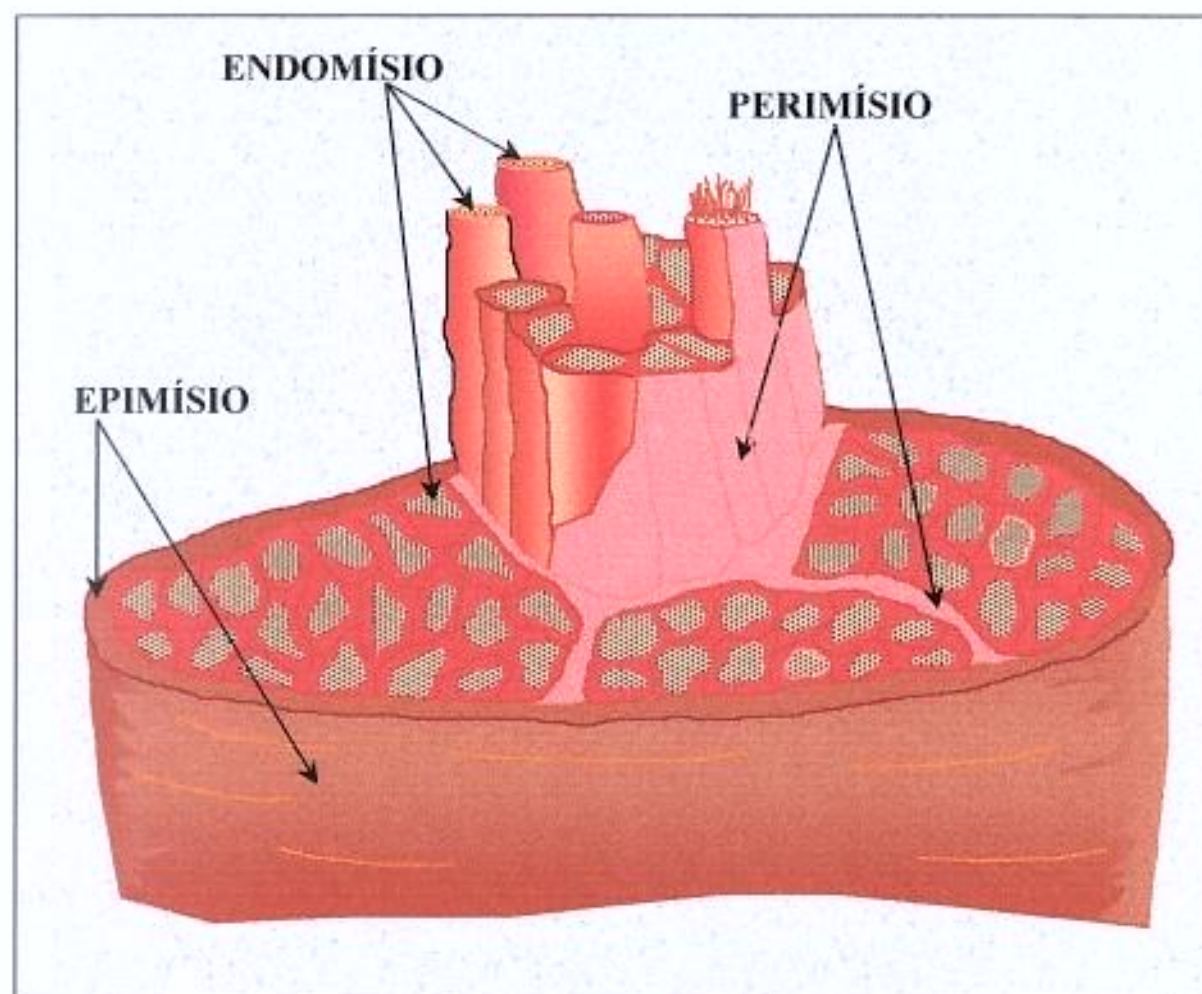


figura 8: Representação esquemática das divisões do tecido conjuntivo que envolve o músculo estriado.

A vascularização do tecido muscular é abundante. As artérias são levadas do epimísio, pelo perimísio, até o interior do músculo. Elas se desdobram em arteríolas e capilares, que são levados até o endomísio. Os linfáticos estão localizados no tecido conjuntivo.

A inervação do músculo é feita pela unidade motora, formada por uma fibra nervosa e pelo conjunto fibromuscular por ela innervado. O número de fibras musculares

A reação provocada pelo laser, como vimos anteriormente, depende das propriedades particulares do tecido, do tempo de exposição, da potência e do tamanho do ponto (LUCIANO *et al.*, 1987). Em função de seu grande efeito térmico, é utilizado para corte, cauterização e volatilização.

A variedade de danos térmicos ocasionados nos tecidos foi resumida na tabela abaixo por THOMSEN, (1991).

Interação fototérmica	Temperatura aplicada	Efeito histopatológico
Baixa temperatura processo de lesão tecidual	40 - 45	Inativação de enzima; dano celular reversível
	43 - 45 +	Inativação de enzimas; morte celular
	?	Contração celular e hipercromasia
	43+	Perda da birrefringência em miocárdio congelado
	?	Desnaturação térmica de proteínas estruturais
	?	Rotura de membrana
	58+	Hialinização do colágeno
	69 - 72	Perda da refringência em miocárdio fresco
Vaporização da água	70 - 75	Mudança da refringência do colágeno
	140 +	Desnaturação térmica da elastina
	100 +	Formação de vacúolos extracelulares
	> 100	Rotura dos vacúolos: efeito “pipoca”
Ablação por alta temperatura	?	Ablação de tecido por vaporização explosiva
	300 -	Ablação de tecido
	1000 +	
	3550	Vaporização do carbono

tabela 1 : Efeitos fototérmicos e danos da interação de laser com tecido biológico.

Sua aplicação é realizada através do braço articulado para bisturi e endoscópio rígido, microscópio e, atualmente, pelo guia de onda. As características inerentes ao laser CO2 trazem uma série de vantagens na aplicação cirúrgica.

A falta de contato do instrumental com o tecido determina menor manipulação e, conseqüentemente, menos trauma mecânico. É possível um cálculo preciso da quantidade de energia fornecida ao tecido. O laser corta, cauterizando, determinando menor

sangramento e melhor hemostasia, facilitando e abreviando o tempo cirúrgico. Requer menor quantidade de instrumental e permite melhor visualização do campo cirúrgico. Não causa interferências em marcapassos e monitores (JAIN, 1983; TICHÝ *et al.*, 1988b).

As vantagens de emprego do laser em cirurgia motivaram a sua utilização em Otorrinolaringologia, Ginecologia, Dermatologia, Cirurgia Geral e Plástica.

As propriedades físicas, as características do tecido e a forma como se dá sua interação com o laser são fundamentais para definir os parâmetros da utilização deste. Assim, faz-se necessário o estudo de particularidades do tecido muscular estriado.

1.2. TECIDO MUSCULAR ESTRIADO

O tecido muscular estriado, que representa uma parte importante do organismo dos mamíferos, é formado por um conjunto de células musculares e tecido conjuntivo. A célula muscular apresenta funções mais específicas que a primitiva, graças a um processo de especialização denominado diferenciação celular. Ela se alonga, sintetiza proteínas fibrilares contráteis e dá origem a uma célula em forma de fuso, chamada fibra muscular, cuja função é a conversão de energia química em trabalho mecânico (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1979; MASTAGLIA & WALTON, 1982).

Os tecidos musculares são responsáveis pelos movimentos corporais e distinguem-se em três tipos, de acordo com suas características morfológicas e funcionais: músculo liso, estriado e estriado cardíaco. Terá estudo aprofundado o músculo estriado esquelético por ser o tecido escolhido para o desenvolvimento deste trabalho.

O músculo estriado é formado por feixes de células muito longas, cilíndricas, multinucleadas, com núcleos periféricos e de formato alongado e ovóide, e sustentadas por tecido conjuntivo. O citoplasma das fibras musculares é composto por miofibrilas, dispostas longitudinalmente e contidas no sarcoplasma, dando a aparência de estriado ao corte longitudinal. O aspecto estriado visto nos cortes transversais é característica exclusiva

varia de acordo com o tipo de trabalho executado pelo músculo (HAM & CORMAK, 1983).

1.3. REPARAÇÃO TECIDUAL

As células musculares e o próprio organismo, como um todo, encontram-se em constante estado de equilíbrio. Os estresses ou estímulos externos excessivos provocam inúmeras alterações celulares, que podem ser apenas de adaptação ou podem evoluir para lesão celular. Na adaptação, a célula sofre modificações e alcança um novo equilíbrio, no qual, embora alterado, ainda se encontra viável. Ultrapassados os limites da capacidade adaptativa, ocorre a lesão celular, que pode variar de ligeira a letal (ROBINS, COTRAN, KUMAR, 1986).

A natureza e a intensidade do agente agressor e o estado intrínseco da célula podem determinar a ocorrência de apenas uma resposta adaptativa ou uma lesão reversível ou, ainda, uma lesão irreversível com morte celular. Um mesmo agente agressor pode determinar, no tecido, diferentes graus de alteração celular.

Tais alterações vão desde apenas um aumento na permeabilidade da membrana celular, causando tumefação, lesão ainda considerada reversível, passando por um estágio mais avançado, com a formação de grandes vacúolos no citoplasma, denominado degeneração vacuolar, até chegar a uma fase irreversível, com necrose celular (PAOLA, 1977; ROBINS *et al.*, 1986).

As células, quando sofrem agressão, reagem com uma sequência de transformações morfológicas para limitar o dano e promover a restauração tecidual.

A restauração dos tecidos ou reparação tem uma importância fundamental em cirurgia. É imprescindível ao cirurgião o conhecimento do processo da reparação, do comportamento de cada tecido e da influência de fatores intrínsecos e extrínsecos no resultado operatório (BEVILAQUA, CHAP CHAP, ALMEIDA, 1981).

A reconstituição dos tecidos lesados ocorre de uma forma dinâmica e se processa basicamente em três fases:

- Fase de necrose
- Fase de demarcação e reabsorção
- Fase de reparação

Na fase de necrose, o agente agressor determina uma solução de continuidade no tecido através da destruição das células e do suprimento vascular local, com acúmulo de sangue e material desvitalizado entre os lábios da ferida. Esta fase serve de estímulo para a seguinte, chamada de demarcação e reabsorção, fase caracterizada por reação inflamatória que se distingue pela hiperemia, exudação e migração leucocitária e pela lise dos elementos celulares desvitalizados (BOGLIOLO *et al.*, 1987; GONÇALVES, 1988).

Imediatamente após uma agressão local aguda, ocorre contração tecidual e vascular momentânea e transitória, substituída pela vasodilatação causada por substâncias químicas formadas ou liberadas no local, responsáveis pelos fenômenos vasculares, exudativos e produtivo-reparadores da inflamação (DUNPHY, 1960).

A vasodilatação também provoca diminuição do fluxo e, conseqüentemente, estase vascular seguida do aumento da concentração das hemácias e viscosidade sanguínea. A hemoconcentração, o aumento da pressão capilar e a permeabilidade vascular permitem a passagem de fluido através da parede dos vasos para o tecido onde se acumulam; esta exudação provoca o edema local. A estase sanguínea também é responsável pelo deslocamento dos leucócitos, que normalmente se encontram na porção central da corrente sanguínea, e daí migram para a periferia, através da parede vascular que apresenta a permeabilidade aumentada. Os produtos do tecido lesado são agentes quimiotáticos importantes na migração leucocitária em direção ao local danificado. Os peptídeos básicos, cininas e sistema complemento, liberados a partir dos sistemas proteolíticos do plasma e das membranas, durante a lise celular, atraem principalmente os neutrófilos (EDWARDS & DUNPHY, 1958; ROBINS *et al.*, 1986; BOGLIOLO *et al.*, 1987). Os neutrófilos se movimentam com mais facilidade que outras células, portanto são os primeiros a chegar, nas primeiras 24 horas, seguidos pelos monócitos. No início da reação inflamatória ocorre

um predomínio de neutrófilos, cuja função é a fagocitose de bactérias ou de fragmentos de tecido; depois se desintegram, liberando fermentos proteolíticos que digerem o tecido necrótico, fibrina e outras estruturas, produzindo liquefação da área. Os macrófagos, que se originam dos monócitos ou provêm das células locais do sistema reticuloendotelial, são mais lentos e aparecem mais tarde, entre 24 e 72 horas, embora permaneçam mais tempo, por serem mais resistentes. Eles são altamente fagocíticos, limpam a área e precedem o reparo tecidual. As células gigantes são multinucleadas, formadas a partir da confluência de macrófagos e encontradas quando existem materiais resistentes à absorção, por exemplo corpos estranhos (HAMMAR, 1993).

Paralelamente ao processo de inflamação inicia-se a fase de reparação, cuja função é substituir o tecido danificado. Nesta fase, forma-se o tecido de granulação, predominantemente composto por fibroblastos e capilares. Pode-se observar, também, neovascularização. A proliferação de fibroblastos inicia-se no 3º dia e em torno do 10º dia de pós-operatório os mesmos já representam metade do número de células presentes na ferida (HUNT, 1988). Os fibroblastos são formados a partir de células mesenquimais autóctones vizinhas.

À medida que o tempo passa, ocorre evolução e maturação na estrutura neoformada, aumentando a resistência e diminuindo a elasticidade na região do tecido que foi reparado. Isto pode ser confirmado macroscopicamente, pelo aspecto avermelhado e hipertrófico da cicatriz nas primeiras semanas, passando à fina e deprimida com coloração perlácea, após sua maturação. Tais alterações são verificadas à microscopia óptica, como um espessamento das fibras colágenas, redução de fibroblastos e da vascularização (GONÇALVES, 1988; ECKERSLEY & DUDLEY, 1988).

O reparo de um tecido lesado pode ocorrer de formas distintas, dependendo do tipo de tecido em questão (MEDAWAR, 1945; ANDERSON & SCOTTI, 1976).

Regeneração é a substituição das células destruídas por novas células da mesma natureza e ocorre quando se trata de um tecido em renovação ou um tecido estável.

Cicatrização é a substituição, por tecido conjuntivo, do tecido acometido por extensa lesão.

O reparo é classificado em : primário, secundário e terciário

No reparo por primeira intenção ou primário, a perda tecidual é pequena, sendo possível a aproximação das bordas da lesão através de sutura. A ferida eletiva ou traumática é limpa e fechada. O reparo por segunda intenção ou secundário é caracterizado por extensa perda de tecido e impossibilidade de aproximação de suas bordas. A ferida limpa, eletiva ou traumática permanece aberta. O reparo por terceira intenção ou terciário permanece aberto inicialmente e, posteriormente, durante a fase de granulação, suas bordas são aproximadas por sutura. Esse tipo de cicatrização acontece com feridas infectadas (ENQUIST, 1970).

Por todos os aspectos mencionados anteriormente, existem alguns conceitos fundamentais que devem ser considerados durante uma intervenção cirúrgica, para um bom reparo tecidual:

- técnica operatória
- menor manipulação tecidual
- boa incisão
- menor maceração e isquemia
- boa hemostasia
- menor contaminação
- remoção dos tecidos desvitalizados
- boa aproximação das bordas
- fios adequados
- fatores locais
- fatores sistêmicos.

Portanto, para um bom reparo, quanto menor a intensidade do traumatismo e mais reduzida a quantidade de resíduos na ferida, melhor (SILVER, 1984).

A reparação de modo geral acontece desta forma, embora cada tecido apresente algumas diferenças durante a evolução do processo, conforme podemos observar no muscular estriado, complementando este estudo.

1.4. REPARO DO TECIDO MUSCULAR ESTRIADO

O tecido muscular, por suas propriedades particulares já citadas, apresenta peculiaridades quando sofre um dano e promove sua reparação.

Vários tipos de acometimentos podem determinar uma necrose seletiva das fibras musculares, com preservação da lâmina basal e do endomísio, ou não-seletiva, sem preservação das estruturas anteriormente mencionadas. Necrose disseminada isolada das fibras musculares (também chamada necrose seletiva) ocorre em consequência de reações imunológicas, distúrbios genéticos, nutricionais e inflamatórios. Infartos (necrose não-seletiva de todas as células do tecido) podem ser causados por trauma ou isquemia prolongada.

As duas formas de necrose são fundamentais na determinação do processo regenerativo. No primeiro caso, as novas fibras musculares se formam a partir de células satélites. O endomísio e lâmina basal permanecem intactos, facilitando a regeneração e mantendo a arquitetura original do tecido (regeneração isomórfica). No segundo caso, as novas fibras são formadas na presença de tecido conjuntivo. A falta de endomísio e das lâminas basais provoca desorganização das fibras musculares novas, o que torna a arquitetura do novo tecido diferente da original. Este processo denomina-se regeneração anisomórfica. A reparação isomórfica é sempre mais efetiva que a anisomórfica (MASTAGLIA & WALTON, 1982).

O agente agressor determina, no tecido muscular, destruição das células e do suprimento vascular local, provocando necrose da região afetada, que se reflete morfollogicamente através da hialinização do sarcoplasma, o qual se torna homogeneizado, eosinofílico e vacuolizado (DANIEL & STRICH, 1979). Ocorre também a contração das

fibras musculares, com a presença de edema entre as mesmas, perda das estrias. Os núcleos tornam-se picnóticos, podendo até desaparecer.

Essas transformações são seguidas por uma reação inflamatória que se caracteriza por hiperemia, exudação e migração leucocitária, com a presença de monócitos e macrófagos miófagos, nos dois primeiros dias, os quais ajudam na remoção e destruição do material degenerado.

Paralelamente ao processo inflamatório, após o terceiro ou quarto dia, percebe-se a presença de fibroblastos e mioblastos, indicando o início do processo de cura das lesões induzidas pelos agressores. Este processo resulta no reparo e na substituição das células danificadas por outras sadias (GARRETT *et al.*, 1984; TICHÝ *et al.*, 1988c).

No músculo ocorre proliferação de fibroblastos e células endoteliais a partir do endomísio, em meio ao volume de células responsáveis pela remoção do tecido necrótico. Nos limites das áreas lesadas verificam-se brotamentos de tecido muscular novo, partindo de cotos de músculos remanescentes vivos (FARIA, 1988). O tecido muscular neoformado apresenta células jovens com sarcoplasma basófilo, sem estrias e com núcleos centralizados e globosos, com nucléolos proeminentes (MASTAGLIA & WALTON, 1982). À medida que o tecido muscular neoformado vai amadurecendo, o sarcoplasma forma estrias, perde basofilia, torna-se mais alongado e o núcleo vai migrando para a periferia e adquirindo um formato fusiforme, assemelhando-se, assim, ao tecido muscular normal.

A recuperação muscular depende da extensão do dano causado ao tecido.

Quando a lesão é grande, ocorre perda de tecido mais extensa entre as bordas do mesmo. Para que ocorra a regeneração, é necessário que o espaço seja preenchido por uma quantidade maior de tecido de granulação e fibroblastos, propiciando a aproximação das bordas e facilitando o fechamento da ferida. Nestes casos ocorre um predomínio de tecido conectivo sobre as células musculares regeneradas e, conseqüentemente, maior fibrose tecidual.

Destruição de pequenas porções entre as bordas da lesão facilita a regeneração muscular, necessitando de menor volume de fibroblastos e possibilitando que o próprio

tecido muscular, neoformado a partir dos brotamentos, preencha esse espaço. Nestes casos, a reparação do tecido se faz com um predomínio de células musculares, conseqüentemente mais próxima ao tecido original e, portanto, de melhor qualidade (GAY & HUNT, 1954; MASTAGLIA & WALTON, 1982).

1.5. REPARO TECIDUAL APÓS UTILIZAÇÃO DO LASER CO2

A interação do laser CO2 com o tecido propiciou seu uso como instrumento cirúrgico e é esse efeito que nos interessa neste trabalho.

Quando um novo instrumento é introduzido em cirurgia é muito importante conhecer seu modo de atuação, bem como a melhor forma de aplicação em diferentes tecidos e em relação às diversas técnicas operatórias. Algumas vezes é necessário remover volumes extensos de tecidos em camadas mais superficiais, onde não se encontram estruturas delicadas como nervos e vasos mais importantes, o que comumente ocorre em Dermatologia, na remoção de manchas, tatuagens e “pellings”. Outras vezes é preciso cortar mais profundamente tecidos repletos de estruturas delicadas que precisam ser preservadas, e onde se faz necessário que o dano tecidual propague-se o mínimo possível. Estas duas situações requerem modos diversos da utilização do laser.

O laser foi comparado com os mais diversos tipos de instrumentos utilizados em cirurgia para verificar os diferentes comportamentos de incisão, qualidade e tempo de cicatrização, com o desenvolvimento de muitas outras pesquisas.

O fato de comparar diferentes instrumentos dificulta a homogeneidade do dano provocado no tecido e, conseqüentemente, sua reparação. Houve divergências entre os resultados obtidos em alguns trabalhos. As diferenças foram atribuídas à dificuldade de padronizar a ação de cada instrumento, os níveis de energia entregue ao tecido, a forma de transferência desta energia, a técnica utilizada e muitos outros parâmetros que interferem na aplicação do laser e sua interação com os diferentes tecidos.

Muitas são as variáveis envolvidas quando se utiliza um laser conforme descrito anteriormente: comprimento de onda, diâmetro do ponto, formato do raio, duração do pulso, tempo e potência.

Compondo estas variáveis, pode-se conseguir uma grande diversidade de efeitos imediatos. Esta afirmação pode ser confirmada pela diferença entre as lesões encontradas por NICOLA (1984), aplicando laser de CO₂ em mucosa oral de cão, em vários grupos. Nesta situação mantinham-se constantes: comprimento de onda (CO₂ 10600 nm), diâmetro do ponto, distância focal (10 mm), tipo de tecido (mucosa oral de cão) e energia final. As variáveis foram: tempo e potência. Lesões obtidas com maior potência e menor tempo eram mais profundas, verticalizadas, com menor perda de tecido na porção central, levando a uma cratera estreita, um halo de necrose menor ao redor da lesão. O oposto foi verificado se quando utilizou menor potência e maior tempo, com lesões superficiais, horizontalizadas, com pequena ou nenhuma perda de tecido central e grande halo de necrose ao redor da lesão. (NICOLA, 1984).

Os achados imediatos deste trabalho motivaram a continuação do estudo, analisando o comportamento das lesões ao longo do tempo, durante o processo de reparo lesional.

2. OBJETIVOS

Este estudo tem como objetivos:

- Avaliar o comportamento, imediato e ao longo do reparo, de diferentes lesões causadas pela aplicação de laser de CO₂, em músculo esquelético, com potência e tempo variados e energia final constante.
- Comparar os resultados obtidos nos grupos de AP x CT e BP x LT.
- Discutir, através de análise morfométrica das lesões, as diferenças histológicas encontradas.
- Tentar comparar, pela análise quantitativa e qualitativa das lesões, o conceito firmado de que a utilização de altas potências em curto tempo apresenta melhor resultado cirúrgico.

3. REVISÃO DA LITERATURA

As idéias iniciais referentes ao laser são de *EINSTEIN (1917), quando descreveu pela primeira vez os conceitos sobre emissão estimulada de radiação. Tais conceitos estimularam outros cientistas como *TOLMAN (1923), que discutiu a possibilidade de amplificação da onda em um meio com algumas condições especiais. *FABRIKANT propôs a obtenção de emissão estimulada. A teoria da emissão estimulada na amplificação de microondas foi apresentada inicialmente em 1953 por *WEBER (1953). Em 1954, os pesquisadores americanos **TOWNES & GORDON e os russos **BASOV & PROKHOROV, em trabalhos independentes, propuseram os princípios das Microondas Amplificadas pela Emissão "Stimulated" de Radiação, palavras cujas iniciais dão origem à forma MASER. Em 1958, surgem as primeiras publicações sobre LASER, em um trabalho realizado por ***SHAWLOW & TOWNES, sugerindo que os princípios básicos aplicados às microondas poderiam também ser adequados à luz. Dois anos após foi construído o primeiro laser de rubi por **MAINMAM (1960) e a seguir muitos outros lasers foram desenvolvidos. Em 1961, *JAVAN produziu o de hélio-neônio (He-Ne) e **JOHNSON & NASSAU desenvolveram o neodymium-YAG (Nd-YAG) laser. Em 1964 **PATEL criou o primeiro laser de CO₂ e no mesmo ano surgiram os lasers de argônio, criptônio e xenônio. Paralelamente ao desenvolvimento dos inúmeros lasers, seus efeitos e aplicações em diversas áreas foram sendo pesquisados.

Na Medicina, o laser surgiu como um novo instrumento cirúrgico e foi empregado em experimentos para avaliar seus efeitos nos tecidos biológicos e a melhor maneira de utilizá-lo nas cirurgias. As pesquisas iniciais foram fundamentais para o conhecimento das diferenças na absorção tecidual, com o uso de diferentes comprimentos de onda dos lasers

*EINSTEIN, A.; TOLMAN; FABRIKANT, V. A.; WEBER, J.; JAVAN A. apud GOLDMAN, L. & ROCKWELL, R. J. Jr. - *Laser In Medicine*. 14 ed. New York Gordon and Breach, Science Publishers, 1971. p. 385.

**MAINMAM, T.; TOWNES, C. H. & GORDON e BASOV, N. G. & PROKHOROV, M. A.; JOHNSON & NASSAU; PATEL, C. K. apud BELLINA, J.H.; FICK, A.C.; JACKON, J.D - *Laser in Gynecology: an historical/ developmental overview. Lasers Surg. Med.*, 5: 1-22, 1985.

***SHAWLOW, A. L. & TOWNES, C. H. apud NICOLA, E. M. D. - - Caracterização de micro lesões produzidas por laser CO₂ na mucosa oral de cães, em função da variação de parâmetros intrínsecos do equipamento. Campinas - S.P., 1984. (Tese - Doutorado - Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas)

Inicialmente o laser de rubi foi empregado com sucesso em Oftalmologia, graças a sua boa transmissão por tecidos transparentes e grande absorção pela retina. O laser de argônio, desenvolvido em 1964, veio ocupar o lugar do laser de rubi na oftalmologia pois, além de sua boa transmissão, absorção pela retina e pelos pigmentos de hemoglobina, operava em modo contínuo que permitia um melhor controle da dosagem de energia. Em 1965 iniciaram-se os experimentos utilizando o laser de CO₂ como bisturi. Os bons resultados encontrados motivaram o desenvolvimento de um gabinete móvel que continha a fonte do laser, os controles e onde foi adaptado um braço articulado com um instrumento manual que contém uma lente de focalização. Isto facilitou ainda mais o uso em cirurgias. Outros acessórios foram desenvolvidos e permitiram sua adaptação ao endoscópio rígido e ao microscópio. ****HALL (1968) iniciou uma série de investigações dos efeitos imediatos do laser de CO₂ nos tecidos e da evolução cicatricial. A reparação das lesões cirúrgicas causadas pela utilização do bisturi de lâmina fria, elétrico e pelo laser de CO₂ foi analisada e comparada por HALL (1971). Os resultados da aplicação em pele e parede abdominal foram colhidos no pós-operatório imediato, 8, 12, 17, 20 e 40 dias. Ficou constatado um atraso na reparação da pele quando se utilizou bisturi elétrico e laser, atribuído à formação de escaras na superfície da pele, que retardavam o início da regeneração. O reparo somente se processava quando todo o tecido necrótico era eliminado. O atraso não foi verificado no músculo, onde a reparação tinha início concomitante com o processo inflamatório, inexistindo a formação da escara (HALL, 1971).

Em seu trabalho publicado na revista Nature, HALL (1971) estudou o comportamento das lesões resultantes da aplicação do laser desfocado e focado. A aplicação do laser desfocado no tecido produzia lesão superficial com características de queimadura: edema, eritema, formação de bolhas e carbonização. As lesões obtidas com o laser focado eram mais profundas, dependendo da potência e tempo utilizados. Essas lesões foram examinadas através da cinematografia colorida de alta velocidade

****HALL, R. R. apud POLANYI T.G. - Laser physics. Otolaryngol. Clin. North Am., 16 : 753- 84, 1963.

Em 1976, MISHASHI, JAKO, STRONG estudaram os aspectos histológicos das lesões induzidas pelo laser de CO₂. Analisaram os efeitos imediatos com a formação de cratera resultante da rápida vaporização da água e ejeção do componente sólido do tecido e o comportamento das lesões durante a evolução cicatricial.

Vários trabalhos foram publicados, a partir desta época, a respeito de laser CO₂ e cicatrização.

Contrariamente ao encontrado por HALL (1971), a reparação das lesões produzidas por bisturi convencional, elétrico e laser CO₂, em pele de porcos, foi analisada por COCHRANE *et al.* (1980), de acordo com a macroscopia e resistência da incisão após 7 dias, os resultados obtidos não mostraram diferença significativa.

BELLINA *et al.* (1984) compararam os efeitos do laser CO₂ com os do eletrocautério em tecido peritônio e o processo de reparação. Encontraram estes autores diferenças importantes entre os dois métodos, avaliando o dano tecidual, aderências e tempo de cicatrização. Em todas as situações, o laser mostrou resultados superiores aos encontrados com o eletrocautério.

Em contrapartida, os resultados obtidos por LUCIANO *et al.* (1987), comparando também o laser de CO₂ e o eletrocautério em trato reprodutivo de ratas, diferem dos estudos realizados por BELLINA *et al.* (1984), não havendo diferenças entre os dois métodos.

KAMAT *et al.* (1986) analisaram a evolução cicatricial de lesões produzidas em pele humana pelo laser CO₂, aplicado com mesma potência, variando tempo de exposição e, conseqüentemente, energia final. Verificaram que as lesões apresentavam aspectos diferentes quanto à profundidade e largura da cratera, e volume de tecido danificado ao redor, em função dos quais constataram variações da cicatrização.

TICHÝ *et al.* (1988) fizeram um estudo sobre o comportamento dos diferentes tecidos com lesões produzidas pelo laser de CO₂. A análise foi baseada na histologia da cicatrização da pele, lobo de orelha, músculo estriado, fígado e baço. Em todos os casos, a presença de tecido carbonizado determinou maior fibrose e atraso na cicatrização.

A comparação entre laser cirúrgico, eletrocautério e bisturi convencional, feita por SCHRÖDER *et al.* (1989), mostrou pequenas diferenças cicatriciais com o uso dos instrumentos. Na rapidez, durante a incisão, os lasers e eletrocautério foram superiores ao bisturi convencional. Considerando a incisão efetuada linear, sem a realização de hemostasia, afastamento das bordas e manipulação tecidual, observamos um menor dano tecidual na seguinte ordem, do menor para o maior: bisturi convencional, seguido pelo laser CO2 em modo superpulso, eletrocautério, laser CO2 em modo contínuo e Nd-YAG laser de contato. O resultado observado em 14 dias mostrou uma diferença pouco significativa, entretanto melhor com o bisturi convencional, em comparação aos outros métodos.

FILMAR *et al.* (1989) compararam os efeitos do laser CO2 e do eletrocautério, segundo alguns parâmetros histológicos: extensão da cicatriz, quantidade de partículas de carbono, fragmentos necróticos, número de polimorfonucleares leucócitos, linfócitos, histiócitos e células gigantes; extensão do edema, exudato e colágeno na cicatriz. Os resultados encontrados quanto à extensão e quantidade de colágeno na cicatriz foram os mesmos. Quanto à reação de corpo estranho, células gigantes em função do maior volume de partículas de carbono, os resultados foram mais pronunciados com o eletrocautério e retardaram a cicatrização.

Comparando a cicatrização de lesões produzidas pelo aspirador cirúrgico ultrassônico com a de outras causadas pelo laser CO2, RADER *et al.* (1992), obtiveram resultados equivalentes para os dois instrumentos.

Pode-se perceber, em todos estes trabalhos, que não houve diferença substancial em termos de qualidade cicatricial, entre as lesões produzidas pelos diversos instrumentos. Mesmo ocorrendo um retardo na cicatrização, sendo utilizados bisturi elétrico e laser CO2, que apresentavam comportamentos semelhantes na carbonização do tecido, o resultado final mostrava-se análogo àquele obtido com bisturi convencional.

No Brasil, o início da utilização do laser de CO2 como instrumental cirúrgico ocorreu em 1975, com a equipe do Departamento de Otorrinolaringologia da F.C. M./UFRGS, desenvolvendo trabalhos em papilomatose laríngea (KUHLE, MALINSKY, FERNANDES, 1977; KUHLE & KUHLE, 1977).

Trabalhos experimentais tiveram início em 1977 com a equipe de cirurgia da Escola Paulista de Medicina, que realizou estudos na área de Gastroenterologia, visando avaliar a atuação do laser CO2 em cirurgia hepática, hemostasia de lesões gástricas sangrantes, bem como seus efeitos como instrumento cirúrgico em geral. Tratando-se de um instrumental que estava sendo introduzido no meio médico, naquela época, muitas pesquisas foram desenvolvidas comparando o laser CO2 com bisturi convencional e elétrico e também sua eficácia imediata e ao longo do tempo na atuação sobre o tecido biológico (GOLDENBERG *et al.*, 1977).

Em 1979, prosseguindo as pesquisas experimentais com lesões gástricas sangrantes, foram comparados laser CO2, instilação de solução de adrenalina e eletrocautério. Os procedimentos transcorreram sem dificuldades, de forma segura, sem complicações e não houve recorrência do sangramento. Os resultados mostraram eficácia de todas as técnicas, entretanto o laser de CO2 foi o que mais rapidamente fez cessar o sangramento (GOLDENBERG *et al.*, 1979).

Estudos para avaliar a cicatrização, utilizando laser de CO2, também foram realizados por esta mesma equipe em 1980. A cicatrização gástrica de cães foi analisada do ponto de vista macroscópico e microscópico, utilizando-se o bisturi convencional e o laser de CO2, após 5 e 15 dias. Na apreciação realizada pelo grupo, os resultados macro e microscópicos obtidos com o bisturi convencional superam os do laser. Os autores atribuíram as diferenças à intensa reação inflamatória, maior edema e ao aparecimento de zonas de necrose. Há uma maior demora na reparação, pela presença do tecido necrótico, que necessita ser removido, retardando o processo. Após 15 dias não se observou diferença entre as duas técnicas. Os resultados encontrados mostram que não houve vantagem na utilização do laser CO2, quanto ao aspecto cicatrização (GOLDENBERG *et al.*, 1980; 1981).

GOLDENBERG (1986) publica um editorial com uma série de resultados encontrados em suas pesquisas e conclui, com base em sua vivência clínica e experiências com o laser CO2, “... *não haver vantagem na utilização do laser de CO2 em cirurgias do aparelho digestivo. Quando muito poderá ser um instrumento auxiliar, complementar, caso o cirurgião julgue vantajoso.* ”.

FAGUNDES (1990), em sua tese de Doutorado, compara o laser de CO₂ com bisturi elétrico na cicatrização de anastomoses cólicas. Os resultados mostraram-se satisfatórios para as duas técnicas, embora do ponto de vista de microscopia óptica e de polarização houvesse vantagens na utilização do bisturi elétrico.

Na UNICAMP, o primeiro trabalho empregando o laser de CO₂ na área médica foi realizado em conjunto pelos Departamentos de Otorrinolaringologia e Anatomia Patológica da F.C.M. e pelo laboratório Prodelco do Departamento do Estado Sólido do Instituto de Física Gleb Wataghin, em 1980. O trabalho experimental mostrou o efeito da radiação do laser CO₂ nacional em mucosa oral de cobaias, comparado com o de uso de lentes com diferentes distâncias focais (NICOLA *et al.*, 1981).

Este trabalho motivou a continuidade de pesquisas na área, com a construção de um laser de dióxido de carbono nacional por LIMA, NICOLA, NICOLA (1983), para utilização cirúrgica, e com a criação de um grupo multidisciplinar de Cirurgia Experimental, com laser instalado no Laboratório de Laser do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental da F.C.M. - UNICAMP (NICOLA, 1984). Neste laboratório foram desenvolvidos inúmeros trabalhos utilizando o laser de dióxido de carbono. NICOLA (1984) desenvolveu sua tese de Doutorado caracterizando microlesões produzidas pelo laser CO₂ na mucosa oral de cães, variando os parâmetros intrínsecos do equipamento. Com base nestes estudos, onde foram avaliados os aspectos imediatos de lesões produzidas pelo laser CO₂, foi desenvolvido um trabalho relacionando a extensão do dano tecidual com a evolução cicatricial de outras, produzidas em pele de rato pelo mesmo laser de CO₂ (COUTINHO, NICOLA, NICOLA, 1994b).

A existência deste laboratório também permitiu o treinamento e familiarização com o equipamento, fundamentos essenciais e imprescindíveis à aplicação clínica realizada em pacientes do H.C. da UNICAMP. A Unidade Multidisciplinar de Medicina Laser instalada no H.C. - UNICAMP foi criada em 1989, onde são realizados procedimentos cirúrgicos de nível ambulatorial, sob anestesia geral e local.

O desenvolvimento de trabalhos clínicos foi favorecido pelo caráter multidisciplinar desta Unidade. O entrosamento das disciplinas Bucomaxilofacial e

Otorrinolaringologia resultou em um trabalho comparativo entre a cirurgia convencional e cirurgia com laser de CO₂, na remoção da hiperplasia gengival (NICOLA *et al.*, 1994a; COUTINHO *et al.*, 1994a).

Com base em trabalhos experimentais sobre a difusão de calor em tecidos biológicos, foi iniciado um estudo referente à atuação do laser de CO₂ no tratamento de hemangiomas sintomáticos da cavidade oral, utilizando uma técnica cirúrgica muito conservadora, desenvolvida no Serviço (NICOLA, JUNQUEIRA, BUSATO, 1994b; JUNQUEIRA, PINOTTI, NICOLA, 1994; NICOLA *et al.*, 1995, 1997).

A existência deste grupo multidisciplinar na UNICAMP tem possibilitado, além da realização dos trabalhos citados anteriormente, a produção de várias dissertações de Mestrado e teses de Doutorado sobre a utilização de laser, tanto de CO₂ como de outros tipos.

O desenvolvimento de novos equipamentos, extremamente avançados, tem estimulado a utilização e aquisição dos mais diversos tipos de laser.

Nos últimos anos têm sido criadas várias associações científicas de especialistas (médicos, odontólogos, fisioterapeutas, veterinários, biólogos entre outros), com o objetivo de normatizar os procedimentos que utilizam o laser e divulgar as novas técnicas que estão sendo cada vez mais desenvolvidas, gerando inúmeros trabalhos científicos em todo país.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Para começar o trabalho seguindo a mesma linha de pesquisa do Laboratório Laser do N.M.C.E. - F.C.M. UNICAMP, era importante conseguir reproduzir as lesões citadas anteriormente e que foram obtidas por Nicola (1984), através da aplicação do laser CO₂ em mucosa oral de cão, para em seguida avaliar o processo de reparação destas lesões. Descartamos imediatamente a possibilidade da aplicação em mucosa oral do cão devido ao tempo de observação do processo reparativo necessário à realização deste trabalho e que iria de encontro ao problema da alimentação do animal. Seria impraticável considerar tais lesões do ponto de vista qualitativo pois, fatalmente durante a dieta normal, ocorreriam danos indesejáveis que as descaracterizariam. Manter o animal em jejum por um tempo prolongado também não seria possível. Por estas dificuldades optamos pela reprodução das lesões, em outro tecido e até mesmo em outro animal, tendo escolhido ratos da raça Wistar, que comumente são utilizados no Laboratório, para outros experimentos.

Ao iniciar este estudo, após a definição do animal, decidimos pela realização do trabalho em pele, o que posteriormente foi alterado para a aplicação em músculo, pelas razões expostas a seguir, bem como no anexo I do presente trabalho:

- as lesões obtidas com os conjuntos de parâmetros anteriormente citados, embora mostrassem diferenças significativas, apresentavam características muito próximas, dificultando a análise dos resultados;
- aumentando os valores de parâmetros como tempo de exposição e potência do laser, as lesões ultrapassavam a espessura da pele, impossibilitando a avaliação global da lesão e, conseqüentemente, da evolução do processo de reparação tecidual.

Decidiu-se pela aplicação do laser em um tecido mais espesso e que comportasse lesões mais distintas entre si. O par de músculos *gluteus maximus* foi escolhido por se localizar em região de fácil acesso e manipulação, podendo ser ressecado integralmente.

4.1. EQUIPAMENTO

Laser de dióxido de carbono nacional, TL 1030, fabricado pela Tecno Laser, pertencente ao Laboratório de Laser do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental da F. C. M. - UNICAMP.

Este laser apresenta potência média de 30W, “spot” de 0,3 -mm, modo ponto compacto (TEM00), aplicação temporizada. É provido de um braço articulado com movimentos ântero-posteriores e laterais e uma “caneta bisturi” bastante anatômica, que permite ao cirurgião muita liberdade de manuseio, durante sua utilização. Na extremidade da caneta foi adaptado um anel metálico, ajustado para o ponto correspondente ao foco do laser, mantendo sempre constante a distância focal (foto 2).

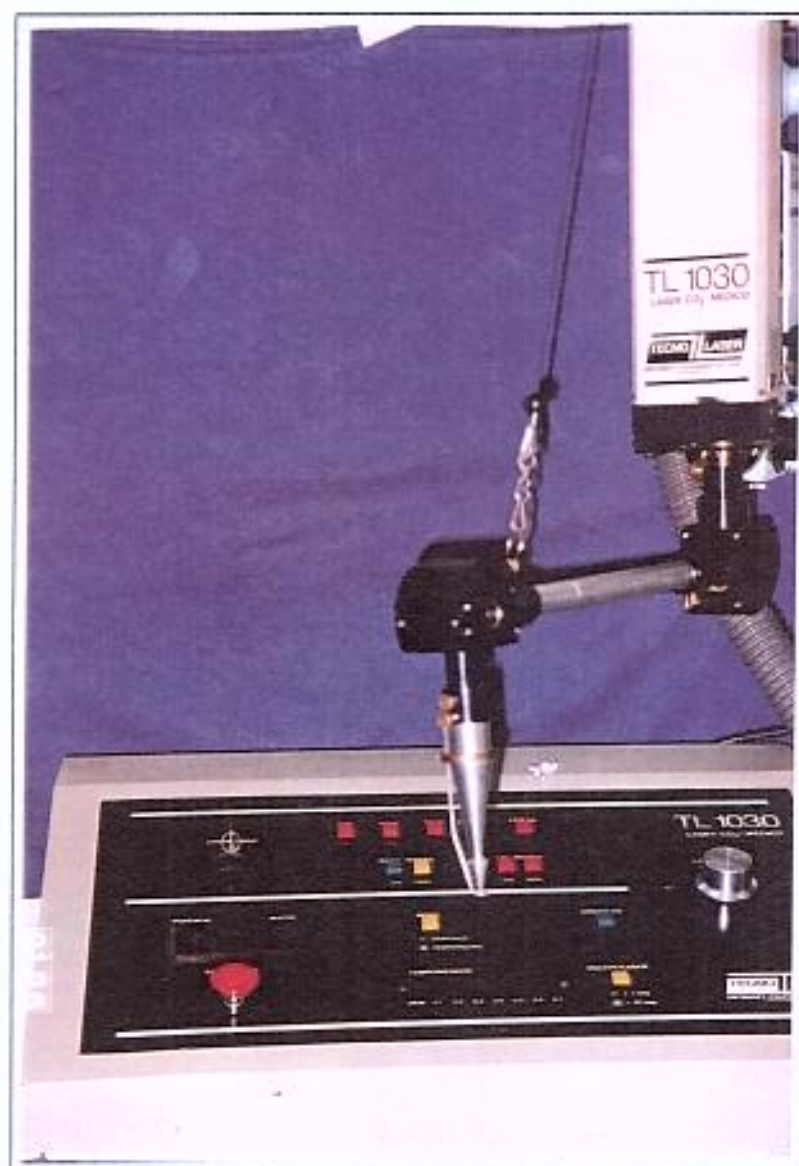


foto 2: Laser CO2 TL 1030, nacional com braço articulado, caneta bisturi e anel posicionador, metálico.

O controle da estabilidade do laser foi obtido através da medida da potência com “powermeter”, “thermopile”, específico para medir o comprimento de onda de 10,600 nm, do laser CO2 (foto 3).



foto 3: Laser CO2 e “powermeter”.

Utilizamos um fragmento de acrílico transparente onde foram aplicados pontos de laser, reproduzindo o formato das lesões produzidas nos ratos (foto 4).

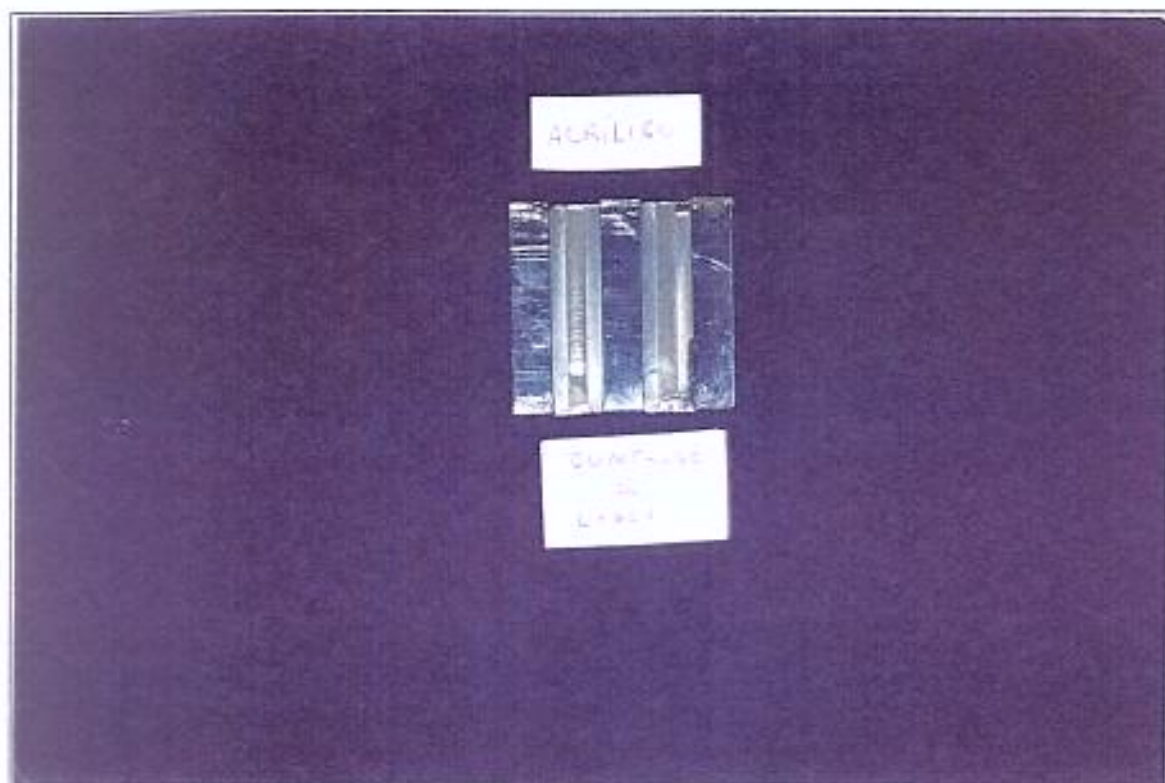


foto 4: Fragmento acrílico, com pontos de laser reproduzindo o formato das lesões.

4.2. ANIMAL DE EXPERIMENTAÇÃO

No experimento utilizamos ratos da raça Wistar, do sexo masculino, isogênicos, fornecidos pelo Biotério da UNICAMP, com idade de três meses e peso médio de 350 gf. Fez-se a aplicação do laser na região dorsal, sobre os músculos *gluteus maximus*, pela boa localização, facilidade técnica para aplicação e remoção.

Os animais foram anestesiados por via inalatória com éter sulfúrico e, após o procedimento, colocados em gaiolas individuais, alimentados com dieta padrão do laboratório (ração apropriada) e água *ad libitum* e sem antibioticoterapia. A utilização das gaiolas individuais evitava o trauma que poderia ser causado por outros ratos.

Testamos diversos conjuntos de lesões, produzidas com variação de potência e tempo, com a finalidade de encontrar as melhores condições de operação do laser. Resultaram lesões características e distintas entre si.

Variando os parâmetros físicos e mantendo energia final constante, chegamos ao seguinte conjunto de combinações de tempo x potência que melhor se adaptava aos objetivos do presente estudo :

$$20W \times 0,5 \text{ seg.} = 10J$$

$$10W \times 1,0 \text{ seg.} = 10J$$

$$05W \times 2,0 \text{ seg.} = 10J.$$

4.3. MÉTODOS

A aplicação *In vivo* era precedida do controle da estabilidade do laser pelo “powermeter” e da reprodução dos mesmos parâmetros em um acrílico transparente, que permitia a visualização do formato, profundidade e contorno das lesões. Assim, as lesões produzidas podiam manter um padrão constante.

Os ratos foram anestesiados com éter sulfúrico e fixados, em posição ventral, em uma prancha. A tricotomia foi realizada com máquina elétrica na região dorsal do animal.

A assepsia das mãos do cirurgião se fez com sabão povidine e álcool iodado e a paramentação, com avental esterilizado em autoclave e colocação de luva estéril. Foi feita anti-sepsia local com álcool iodado e colocação de campo fenestrado estéril. Os campos e instrumental utilizados na cirurgia tiveram esterilização em autoclave.

A aplicação do laser CO2 foi realizada em lotes com 6 ratos, e em cada cirurgia utilizamos novo conjunto de instrumental e luvas.

Fizemos a incisão da pele com bisturi convencional e lâminas descartáveis nº 23, em forma de meia-lua no dorso, próximo à cauda, medindo em torno de 8 cm. A pele foi divulsionada com tesoura de Metzenbaum, rebatida e reparada com pinças Kelly, ficando os músculos bem expostos (foto 5).



foto 5 : Pele da região dorsal rebatida e exposição dos músculos *gluteus maximus*.

Sobre o músculo direito foram feitos três pontos centrados, distando 1 cm entre si, dispostos em sequência linear longitudinal, com as combinações acima citadas.

O músculo esquerdo foi deixado como controle, sem aplicação do laser. Em seguida, sobre cada músculo, usamos um fragmento de plástico estéril e a pele foi recolocada no lugar, suturada com pontos contínuos de algodão 3-0 e mantida sem curativo oclusivo (foto 6).

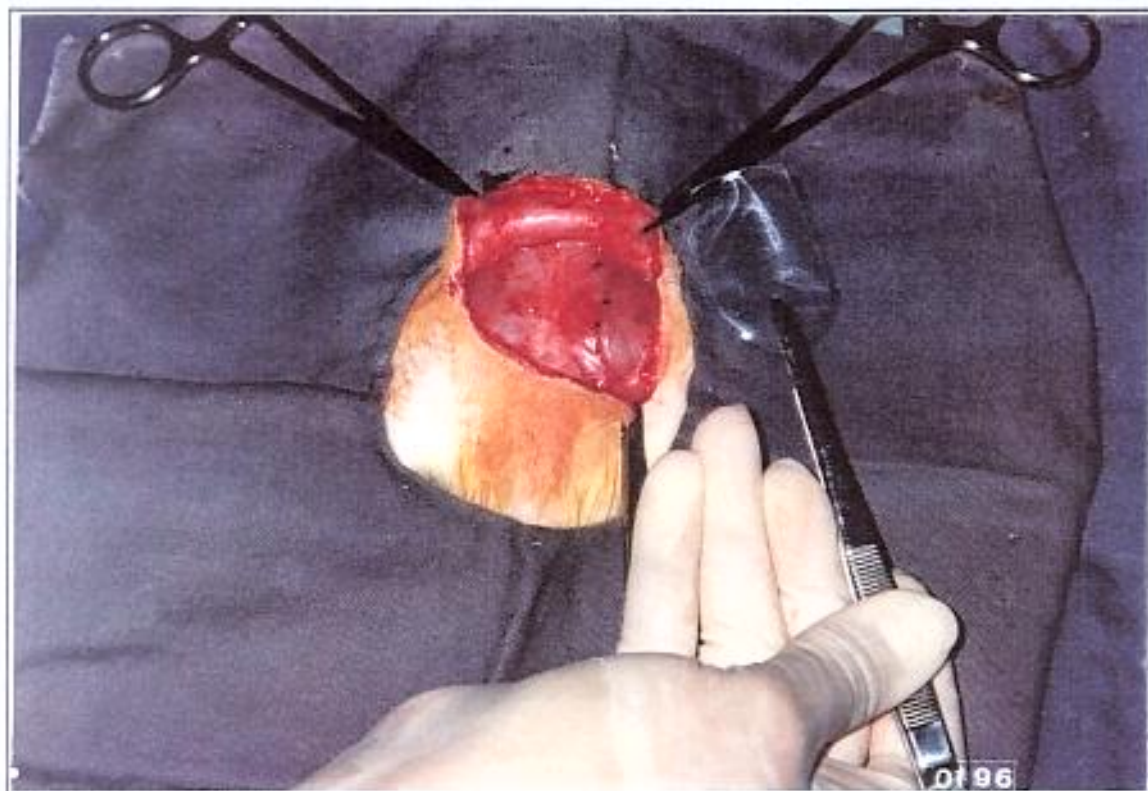


foto 6: Exposição do músculo direito, onde foram aplicados pontos de laser CO2 e músculo esquerdo, deixado como controle. Interposição de fragmento plástico.

Os dois músculos foram ressecados integralmente no pós-operatório imediato e após 1, 4, 7, 15 e 21 dias.

Todos os animais foram sacrificados, imediatamente após a retirada dos músculos, com superdosagem de éter sulfúrico.

O fragmento de tecido muscular contendo os 3 pontos bem como o fragmento de músculo controle foram fixados em formaldeído a 4%, por 24 horas, e depois em álcool 70°. Cada ponto aplicado no fragmento muscular representava uma situação de tempo e potência, respeitando a ordem seguinte, de cima para baixo:

- Alta potência (AP) x curto tempo (CT)-20 W x 0,5 seg. = 10 J.
- Média potência (MP) x médio tempo (MT)-10 W x 1,0 seg. = 10 J.
- Baixa potência (BP) x longo tempo (LT).-05 W x 2,0 seg. = 10 J.

Usamos bisturi de lâmina fria para seccionar os fragmentos de músculos em 3 porções menores, contendo cada qual um dos pontos acima citados; seccionamos também o

fragmento de músculo controle, porém em apenas 2 pequenas partes. Enviamos os cinco fragmentos ao Laboratório de Anatomia Patológica do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental da F. C. M. UNICAMP, tendo realizado o mesmo procedimento para cada um dos ratos.

O material foi rotineiramente desidratado em soluções de concentração crescente de álcool 70%, 80% e 90%, sendo uma hora em cada. A seguir foi diafanizado em xilol durante uma hora, por três vezes, banhado duas vezes em parafina e introduzido em parafina (paraplast) a 60°. Com a solidificação, obtiveram-se blocos de parafina que foram cortados com um micrótomo, da seguinte maneira: com a navalha fizeram-se cortes perpendiculares à superfície do fragmento, desbastando o bloco até que ficasse justaposto à lesão; depois foram feitos 625 cortes seriados, tendo cada um a espessura de 4 micra. Para cada 25 cortes, um foi corado com hematoxilina e eosina e um outro guardado como reserva. Ao final do processo foram obtidas 5 lâminas, contendo 5 cortes cada uma, coradas com H/E, e 5 lâminas com igual número de cortes, não-coradas e mantidas como reserva. A partir das duas frações extraídas de cada músculo controle, confeccionaram-se 3 lâminas com 5 cortes corados e outras 3, sem corar.

Foram coradas 504 lâminas com 5 fragmentos cada, o que resultou num de 2520 fragmentos. Deste total de lâminas coradas, 360 lâminas provinham de músculo onde havia sido aplicado laser de CO₂, totalizando, portanto, 1800 fragmentos com pontos de laser. As restantes 144 lâminas (720 fragmentos) eram de músculo controle, conseqüentemente não continham pontos de laser, mas também foram analisadas sob microscopia óptica. Em cada caso procuramos a lesão mais profunda através de cortes seriados, onde se notava perfeitamente a progressão da injúria tecidual em direção ao ponto central da lesão e, depois deste, a regressão do dano tecidual, mostrando que o centro da lesão já havia sido ultrapassado.

Nos três grupos, AP x CT, MP x MT e BP x LP, as lesões com maior profundidade foram analisadas morfometricamente com um micrômetro na ocular de um microscópio OLYMPUS BH-2, segundo os parâmetros: profundidade total e extensão superior e inferior da cratera, profundidade total (cratera + dano marginal) e extensão superior e inferior da lesão, tecido de regeneração.

A figura 9 mostra os parâmetros morfométricos avaliados sempre na lesão imediata e de maior profundidade : ES = extensão horizontal da cratera causada pela vaporização do tecido, medida na borda superior da lesão; ES total: extensão horizontal total medida na borda superior, incluindo a área vaporizada e a necrose ao redor; EI = extensão horizontal medida no fundo da cratera, somente a área vaporizada; EI total: medida da área vaporizada mais a necrose ao redor da cratera; craP: profundidade da cratera; Total P: medida, na vertical, somando a área vaporizada e a necrosada.

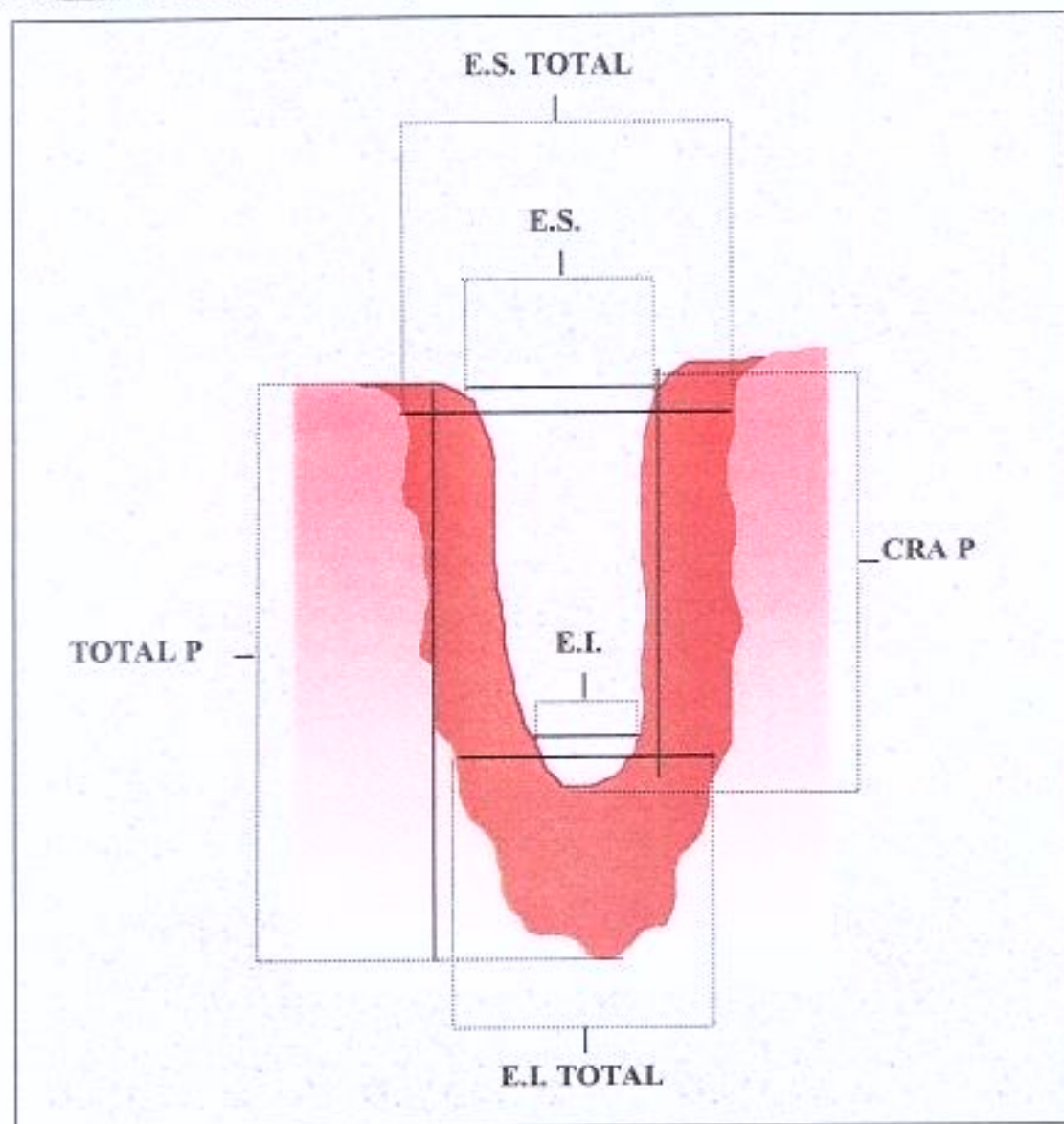


Figura 9 - Parâmetros morfométricos avaliados na lesão imediata.

O parâmetro, tecido regenerado, Tec. reg., era avaliado nas lesões em reparação, ao longo do tempo, sempre naquela de maior profundidade, como mostra a figura 10.

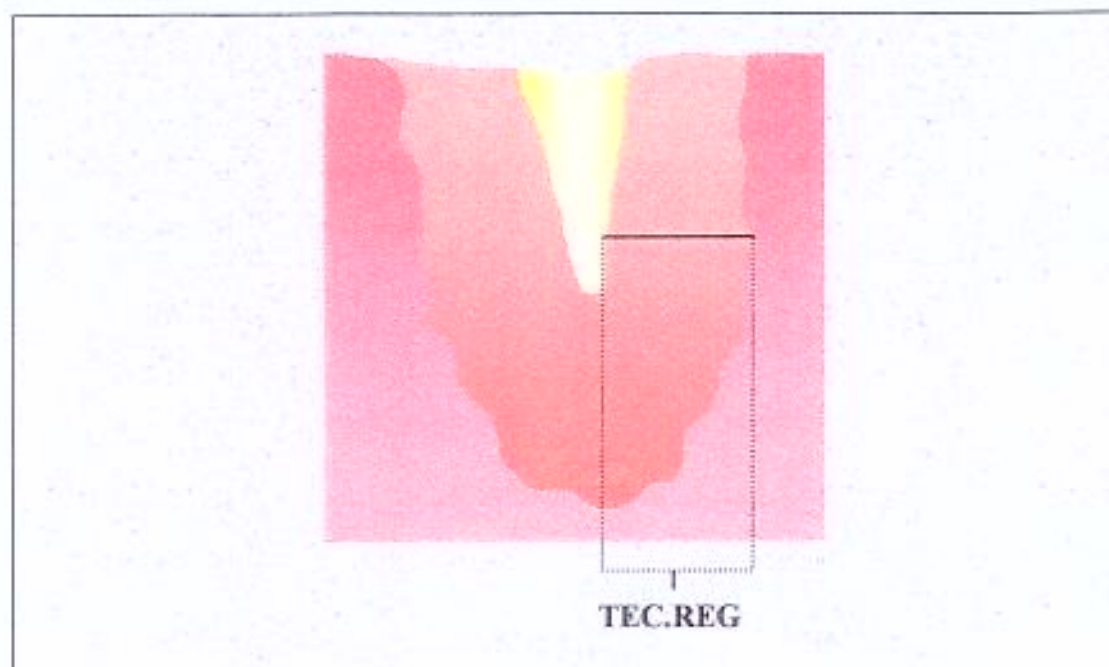


figura 10 - Parâmetro morfométrico analisado nas lesões em reparação.

Análise estatística : Como em cada rato foram provocadas três lesões diferentes simultaneamente , precisamos comparar estes valores em cada animal, para cada parâmetro morfométrico. O teste que mais se aplica a esta situação é o de Friedman, pois entre os elementos dos grupos não podemos esperar uma distribuição normal. Os cálculos foram feitos através do programa WINSTAT 3.1.

5. RESULTADOS

Verificamos diversos graus de carbonização durante a análise do material. No grupo AP x CT, fragmentos de tecido carbonizado eram menos frequentes e apresentavam coloração marrom. Na BP x LT pudemos observar mais frequentemente fragmentos carbonizados de cor preta.

A carbonização apresentou-se numa progressão crescente de AP x CT para BP x LT, com um grau intermediário em MP x MT.

Nas lesões AP x BT observamos que a cratera formada atingiu camadas mais profundas do músculo e a fenda entre as bordas era estreita, apresentando um halo delgado de músculo necrótico com homogeneização e eosinofilia citoplasmáticas e com perda das estrias musculares. Após aplicação do laser MP x MT, a cratera foi mais larga e superficial e o halo de destruição muscular, ao redor, mais largo. Na situação de BP x LT a cratera foi superficial, mais larga e rasa, a fenda formada foi também maior e o halo circundante ainda mais volumoso que nas outras.

Em todos os grupos, após 24 horas, foi possível perceber a presença de intenso edema entre os fascículos musculares que não haviam sido carbonizados pelo laser. Ocorreu também a migração de granulócitos para região lesada, demarcando as áreas queimadas e grande concentração dos mesmos em locais mais carbonizados.

Com 4 dias já podíamos notar a presença de macrófagos, fibroblastos e neovascularização nos três grupos. Os granulócitos ainda eram abundantes, encontravam-se células musculares regenerativas, os mioblastos, que nesta fase se apresentavam como células globosas, com numerosos núcleos vesiculosos e basofilia citoplasmática.

Em 7 dias observávamos maior quantidade de fibroblastos e mioblastos, uma diminuição no número de capilares e um aumento de tecido fibroso determinando maior palidez tecidual. Verificamos ainda, alguns granulócitos.

Passados 15 dias, ocorreu um aumento do número de fibroblastos, que se apresentavam mais densos. Os mioblastos adquiriram aspecto fusiforme e seus núcleos migraram para a periferia. Notamos a presença das células gigantes multinucleadas ao redor de tecido carbonizado.

Transcorridos 21 dias, verificamos tecido conjuntivo bastante denso e mioblastos bem mais alongados que se assemelhavam ao músculo normal. Havia ainda algumas células gigantes presentes.

Embora tenham sido medidas do ponto de vista qualitativo e quantitativo as lesões dos três grupos citados anteriormente, faremos descrição somente dos achados nos grupos extremos, AP x CT e BP x LT, salientando que, de acordo com o esperado, os resultados do grupo intermediário apresentavam características parciais dos dois outros.

Os músculos deixados como controle foram analisados e não apresentaram do ponto de vista imediato, nenhum tipo de lesão. No primeiro dia pós-operatório observamos um processo inflamatório ativo, leve, superficial, que não ultrapassava a fáscia. Esta reação tecidual, devida ao descolamento da pele no ato cirúrgico, desenvolveu-se com um leve processo inflamatório e evoluiu para resolução sem deixar seqüelas.

Durante a aplicação do laser de CO₂ com AP x CT foi possível notar contração muscular (fasciculação) intensa, facilmente visualizada.

Descrevemos a seguir os resultados inerentes a cada fase do processo de reparo tecidual, encontrados na análise microscópica das lesões dos grupos de AP x CT e BP x LT, segundo a evolução cronológica dos seguintes tempos: imediato, após 24 horas, 4, 7 15 e 21 dias.

Nas lesões obtidas com BP x LT, ressecadas imediatamente após a aplicação, verificamos uma cratera cilíndrica cujas margens mostram tecido muscular e conjuntivo carbonizados, constatando graus diferentes de carbonização; e vacúolos dentro da musculatura e do tecido conjuntivo. Observamos sangramentos em graus variáveis, normalmente leves (foto 7).

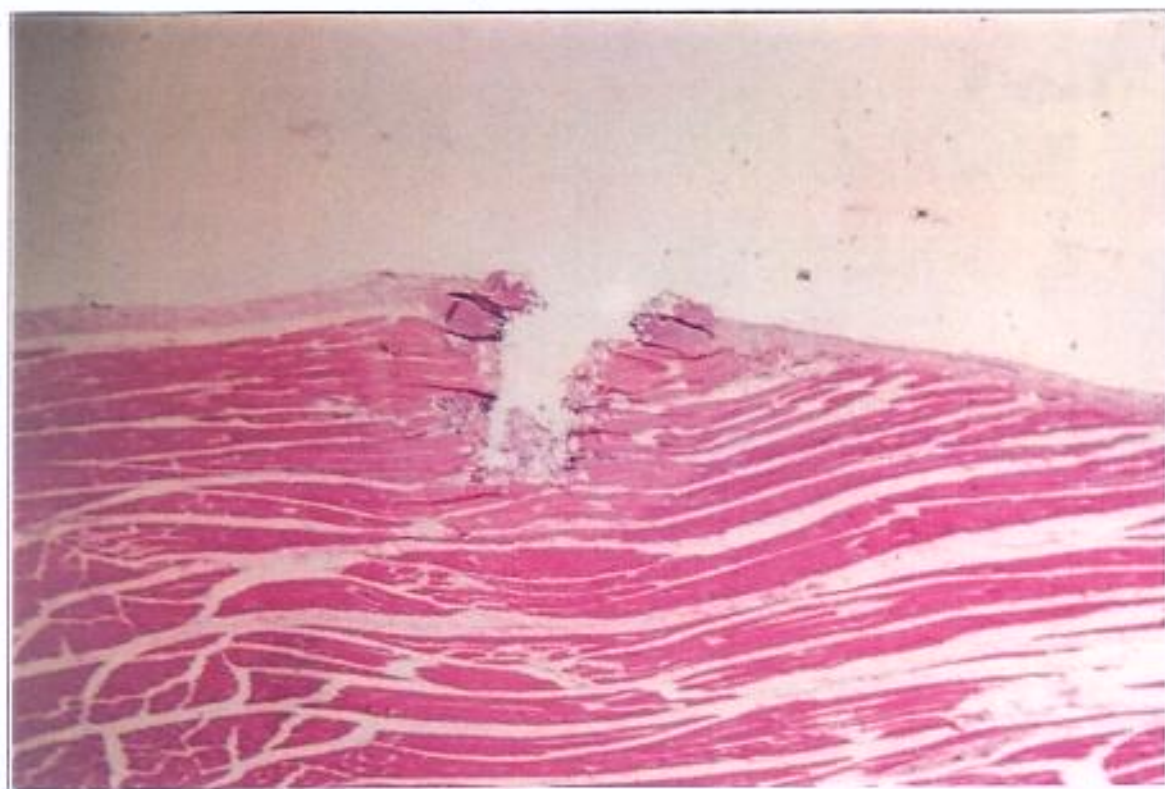


foto 7 - Aspecto microscópico da lesão de BP x LT imediatamente após a aplicação do laser de CO₂ (5,0W x 2,0s) com Objetiva - 1,6.

Ao analisar a lesão de BP x LT, após 1 dia, encontramos exudato granulocitário nas margens da cratera, às vezes muito denso, também permeando as áreas necróticas carbonizadas da margem e os músculos destruídos. Pode-se visualizar melhor a necrose nas margens da lesão. A eosinofilia e homogeneização destacam-se mais. Em muitas fibras musculares o citoplasma começa a se fragmentar intensamente, com granulócitos infiltrando-se nessas áreas (foto 8).

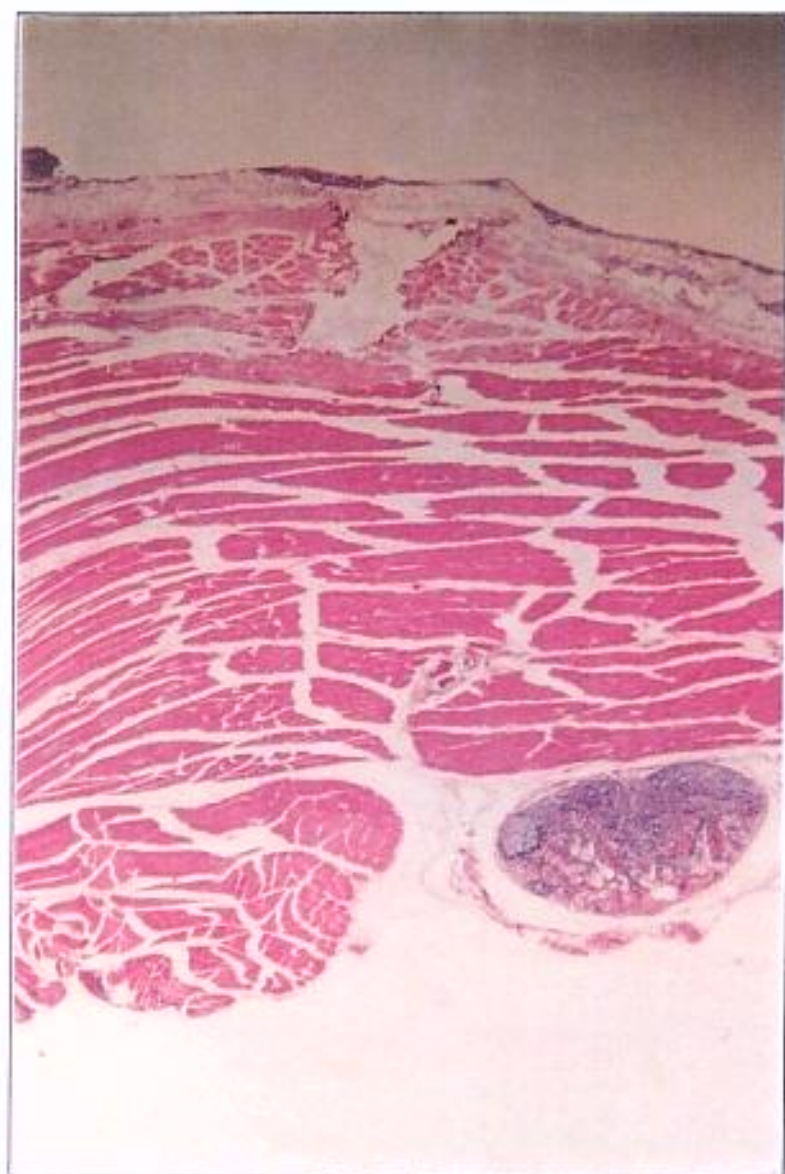


foto 8 - Aspecto microscópico da lesão de BP x LT, após 1 dia da aplicação do laser (5,0W x 2,0s), com Objetiva - 1,6.

Após 4 dias, verificamos na BP x LT a redução no tamanho da cratera. A reação granulocitária na margem da cratera continua intensa, principalmente entre a musculatura carbonizada. Há uma maior presença de macrófagos entre os granulócitos, muitos fibroblastos e brotos de capilares. Pode-se perceber o início do processo reparativo, onde se identifica tecido de granulação jovem, ainda com atividade mitótica (Foto 9).

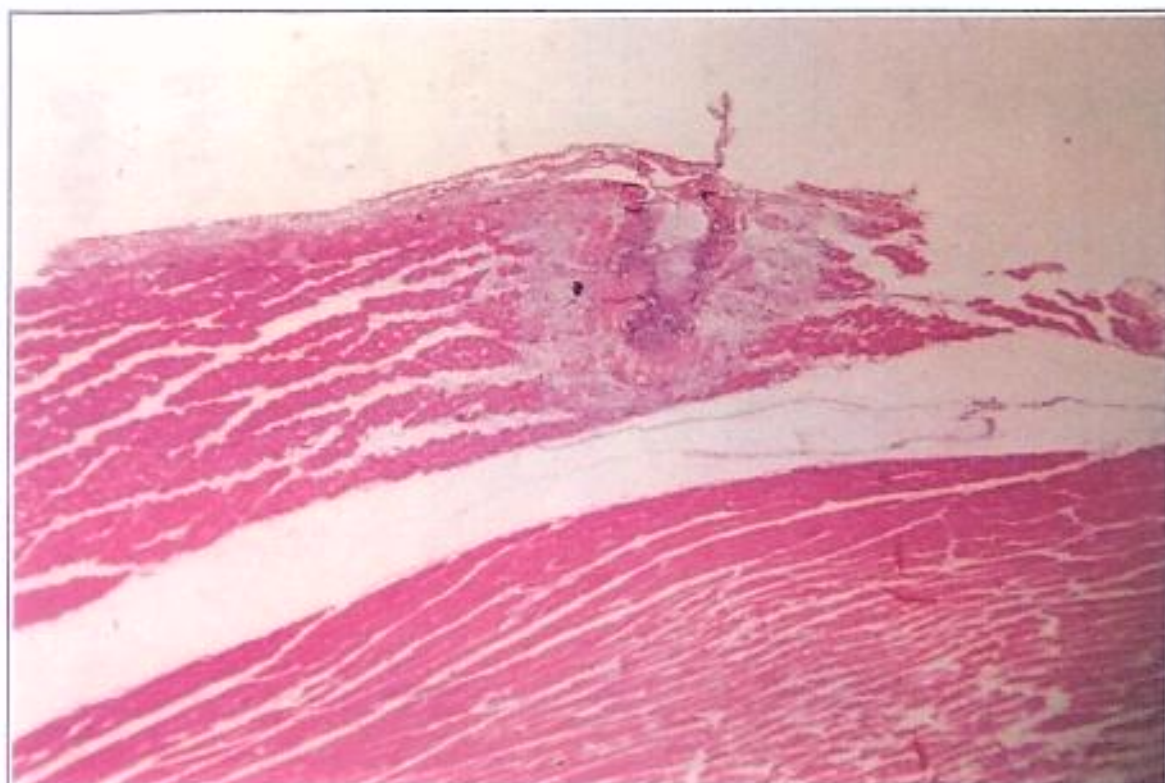


foto 9 - Aspecto microscópico da lesão de BP x LT, 4 dias após a aplicação do laser CO2 (5,0W x 2,0s), com Objetiva - 1,6.

Passados 7 dias da aplicação BP x LT, ocorre diminuição do tamanho e profundidade da cratera de forma mais acentuada. Verificamos tecido de granulação em transição para tecido cicatricial com fibroblastos, fibrócitos, células redondas multinucleadas, restos de tecido carbonizados, poucos granulócitos e mioblastos (foto 10).

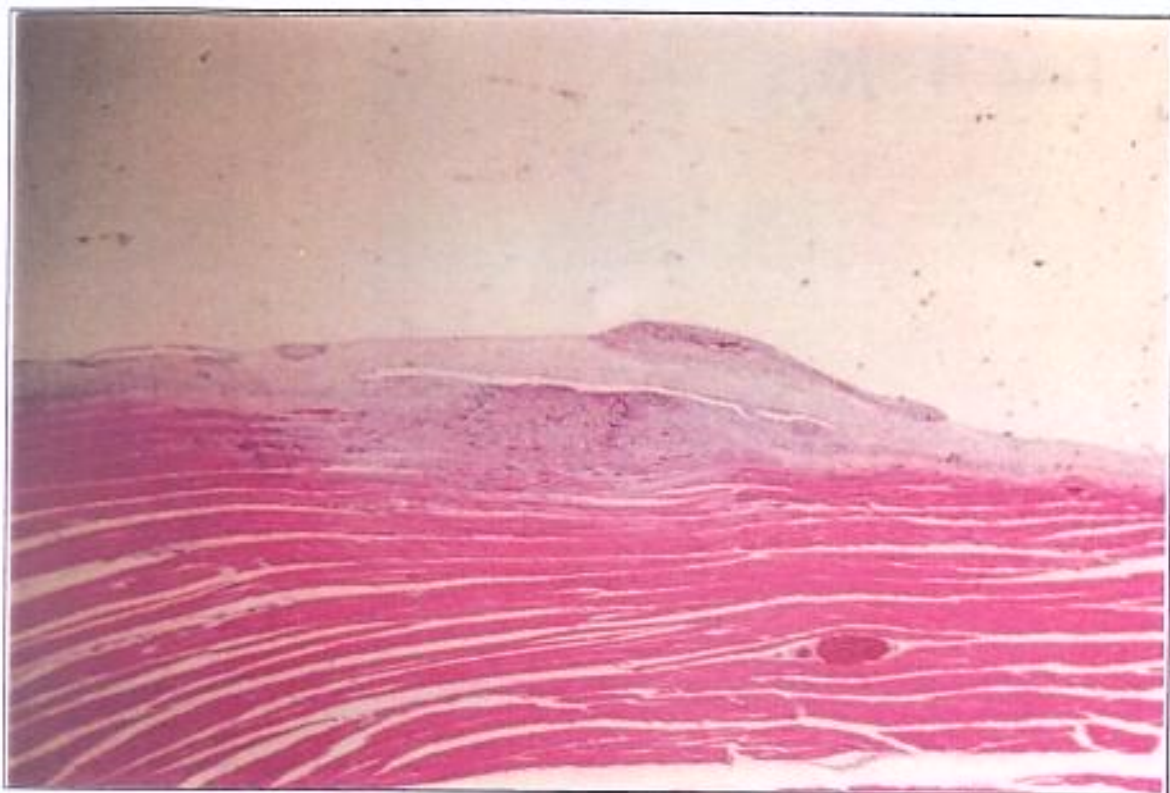


foto 10 - Aspecto microscópico da lesão de BP x LT, 7 dias após a aplicação do laser de CO₂ (5,0W x 2,0s), com Objetiva - 1,6.

O tecido carbonizado residual na BP x LT, após 15 dias, apresenta-se circundado por células gigantes, tipo corpo estranho. Nesta fase a fibrose é menos extensa e muitas fibras estão em regeneração (foto 11).

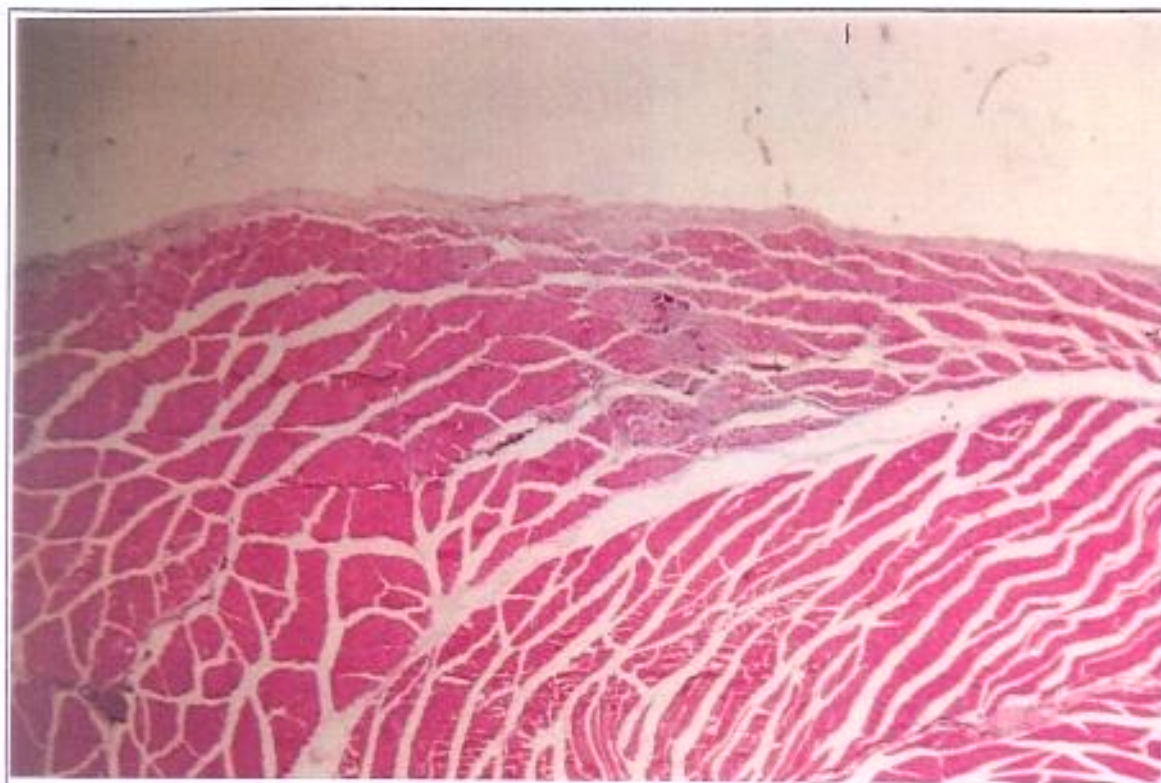


foto 11 - Aspecto microscópico da lesão de BP x LT, 15 dias após a aplicação do laser de CO₂ (5,0W x 2,0s), com Objetiva - 1,6.

A análise da situação de baixa potência e longo tempo, após 21 dias da aplicação, evidencia uma redução bastante acentuada da cratera e a presença de muitos fragmentos carbonizados circundados pelas células gigantes. Há ainda células inflamatórias: linfócitos, plasmócitos e macrófagos residuais. Notamos áreas de fibrose misturadas com zonas de regeneração muscular contendo mioblastos com núcleos vesiculosos e centrais (foto 12).

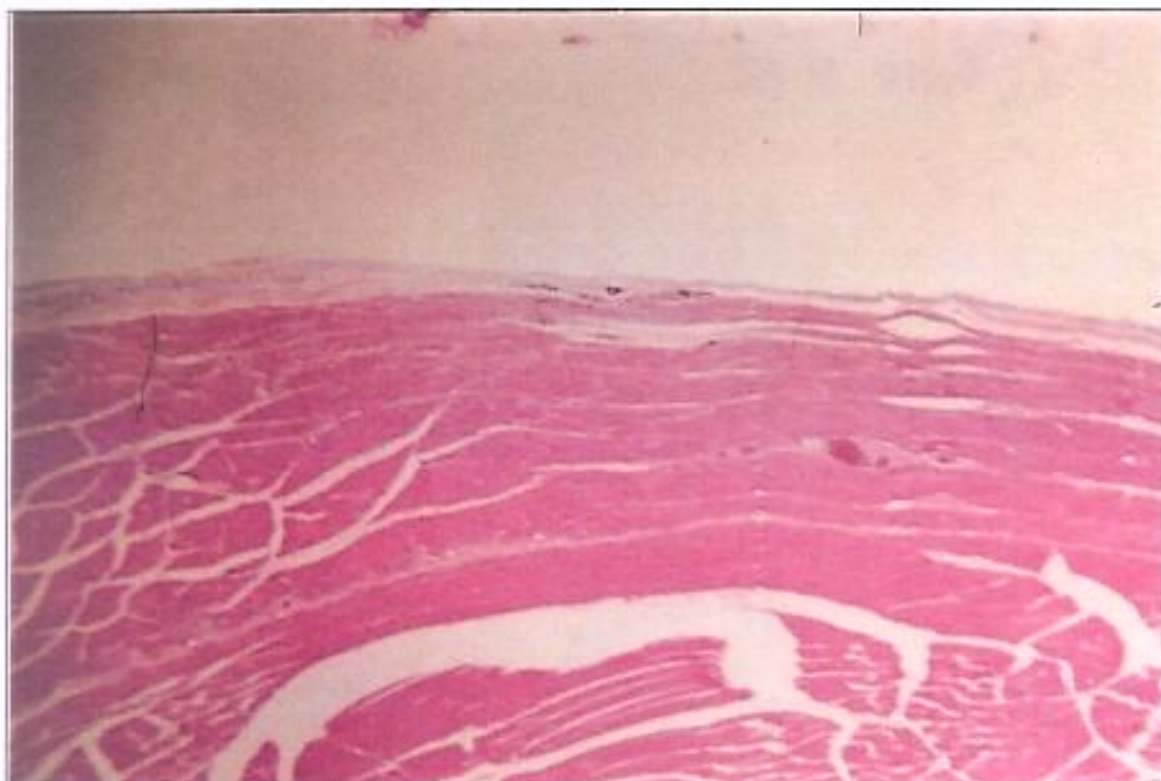


foto 12 - Aspecto da lesão de BP x LT, 21 dias após a aplicação do laser de CO2 (5,0W x 2,0s), com Objetiva - 1,6.

Nas lesões obtidas com AP x CT, ressecadas imediatamente após a aplicação, observamos um canal com escassas áreas carbonizadas, finas e discretas, nas margens. Na maioria dos casos, as partes superiores estão deslocadas do centro, horizontalmente, em função do deslizamento dos fascículos por contração muscular durante a aplicação. Percebemos, além da carbonização das fibras musculares adjacentes, uma perda da arquitetura citoplasmática com homogeneização do citoplasma, que atinge uma coloração de tom mais alaranjado-eosinofílico. Observamos um líquido seroso preenchendo a cratera (foto 13).

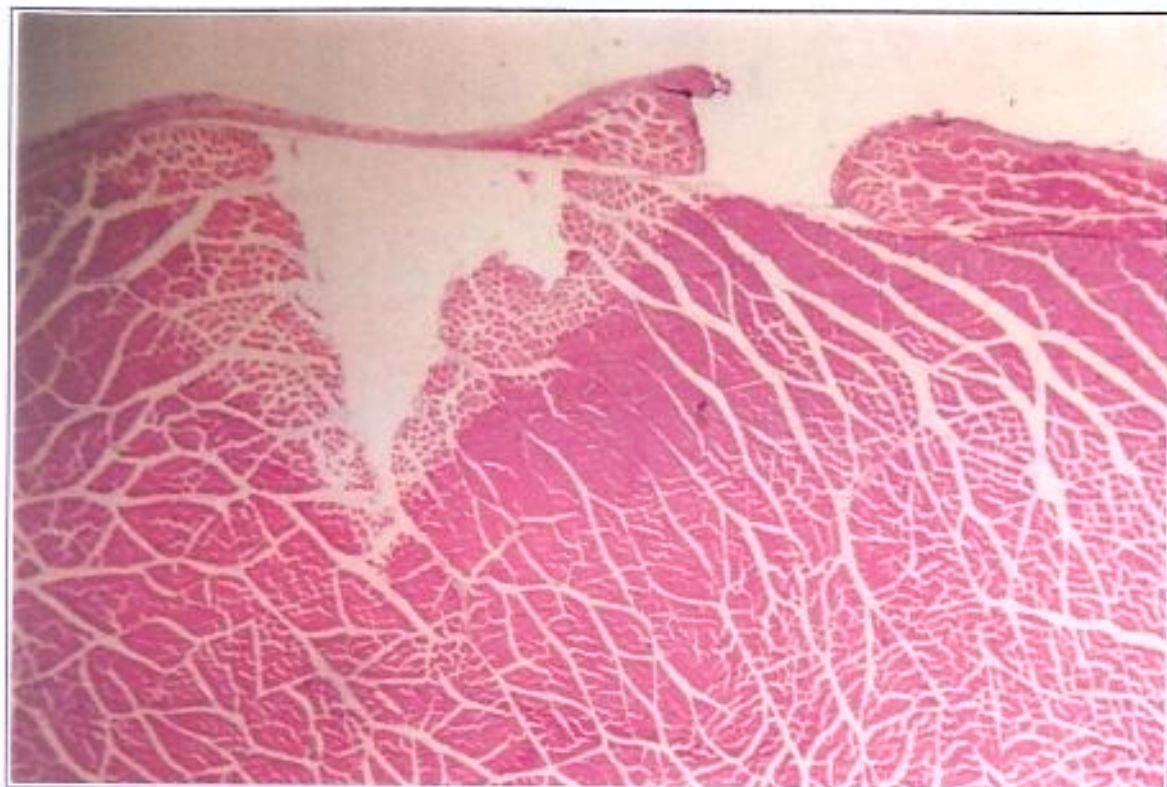


foto 13 - Aspecto microscópico da lesão de AP X CT imediatamente após a aplicação do laser de CO₂ (20W x 0,5s), com Objetiva - 1,6.

Notamos que também na AP x CT o exudato granulocitário é abundante nas margens da cratera. As fibras musculares encontram-se homogeneizadas e eosinofílicas. Há igualmente fragmentação dos músculos e edema intersticial entre as células (foto 14).

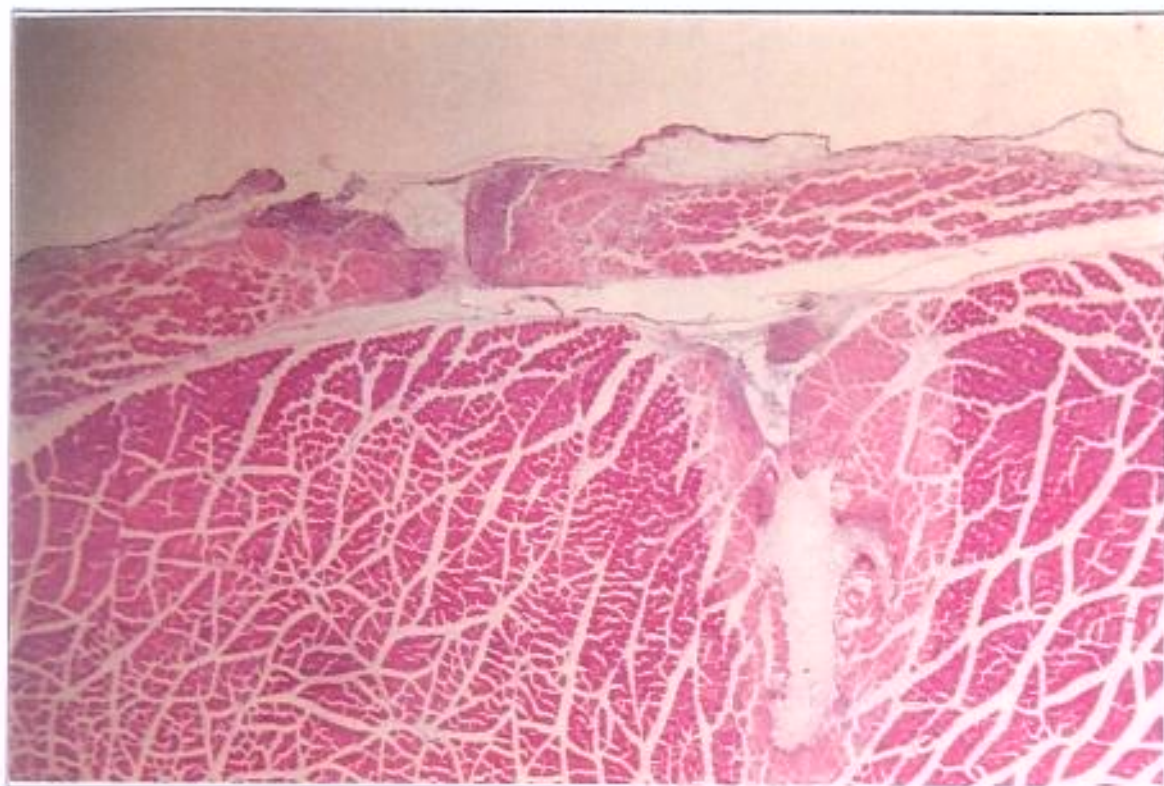


foto 14 - Aspecto da lesão de AP x LT, 1 dia após a aplicação do laser de CO2 (20W x 0,5s), com Objetiva - 1,6.

Na análise da lesão de AP x LT, chama a atenção a intensidade da regeneração muscular. A cratera encontra-se em involução (foto 15).

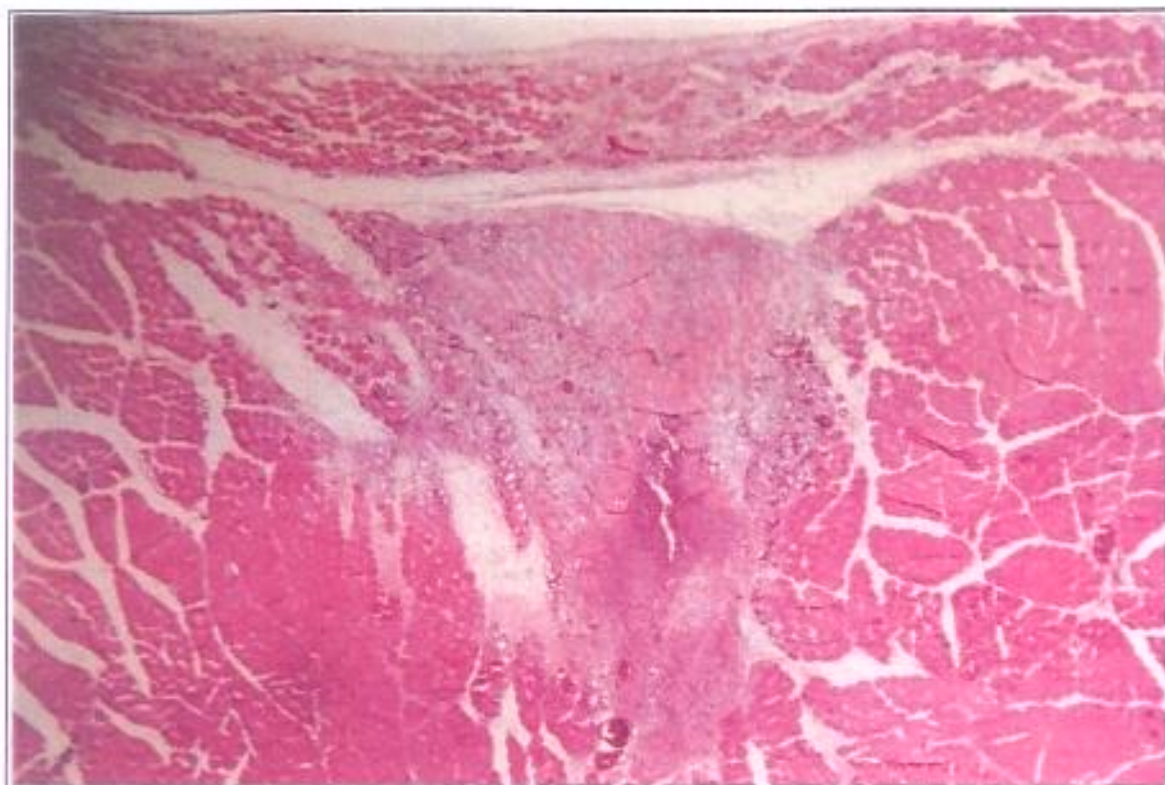


foto 15 - Aspecto da lesão de AP x CT, 4 dias para a aplicação do laser de CO2 (20W x 0,5s), com Objetiva - 1,6.

A cratera da AP x LT encontra-se diminuída após 7 dias, com poucas áreas carbonizadas residuais. Evidencia-se que a fibrose intersticial é menos extensa. A regeneração muscular é mais acentuada, observando-se na periferia muitos mioblastos já em amadurecimento avançado (foto 16).

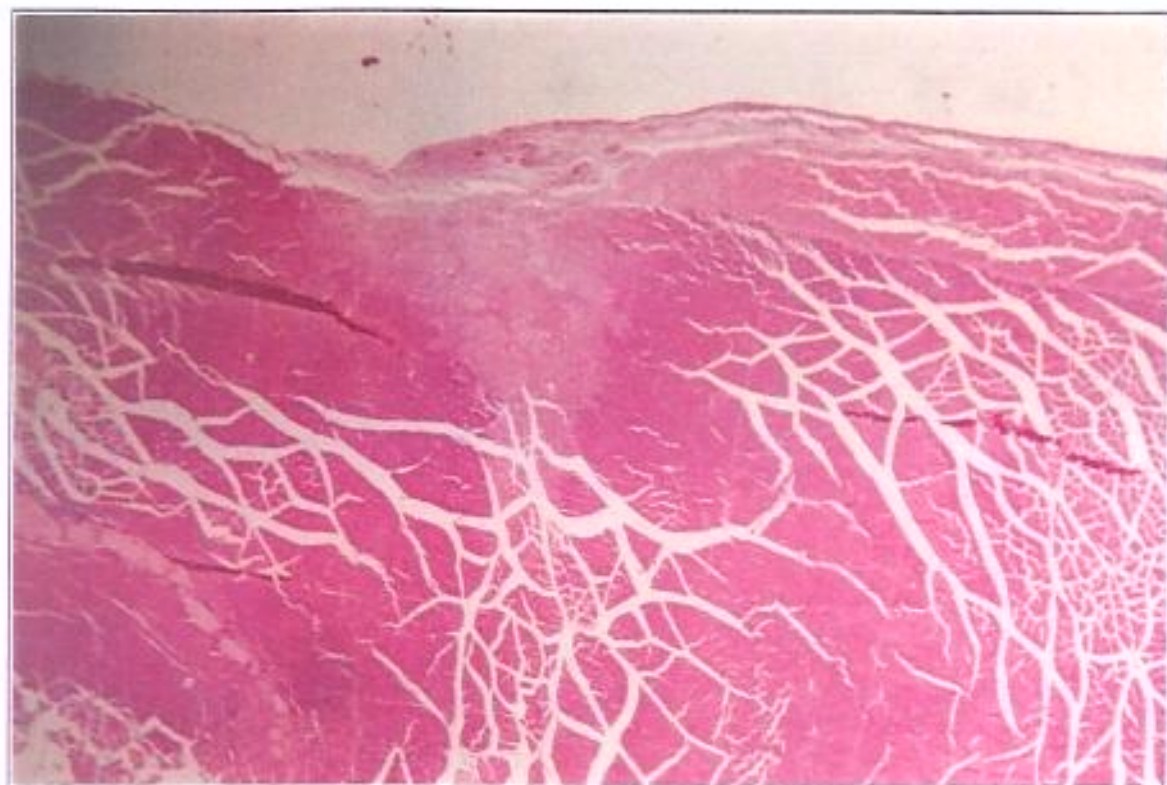


foto 16 - Aspecto da lesão de AP X LT, 7 dias após a aplicação do laser de CO₂ (20W x 0,5s), com Objetiva - 1,6.

Na AP x CT, após 15 dias, área de fibrose é mínima, com pouquíssimos resíduos de tecido carbonizado e com muitas fibras musculares atingindo o calibre e as características de maturidade (foto 17).

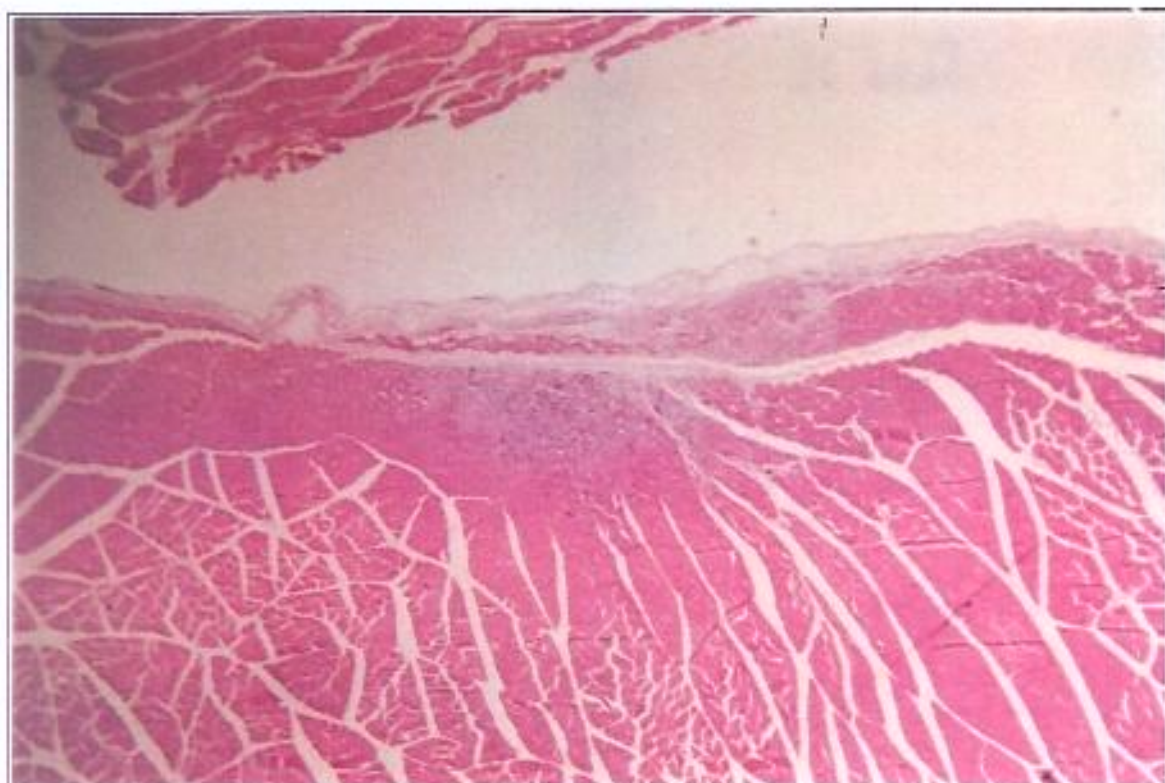


foto 17 - Aspecto da lesão AP x CT, 15 dias após a aplicação do laser de CO₂ (20W x 0,5s), com Objetiva - 1,6.

Passados 21 dias da aplicação de AP x CT, a fibrose intersticial desaparece e poucas áreas apresentam tecido carbonizado circundado por células gigantes (foto 18).



foto 18 - Aspecto da lesão AP x CT 21 dias após a aplicação do laser de CO₂ (20W x 0,5s), com Objetiva - 1,6.

Tabela 2 : Teste Friedman

	postos médios	N	P
comparação da profundidade das crateras (crá P)			
BP x LT	1,29167	12	0,00717
MP x MT	2,16667	12	
AP x CT	2,54167	12	
comparação da medida horizontal na superfície da cratera (ES)			
BP x LT	1,79167	12	0,020961
MP x MT	2,41667	12	
AP x CT	1,79167	12	
comparação da extensão horizontal inferior da cratera (EI)			
BP x LT	1,81818	11	0,02885
MP x MT	2,63636	11	
AP x CT	1,54545	11	
comparação da profundidade total da lesão (Total P)			
BP x LT	1,37500	12	0,02957
MP x MT	2,29167	12	
AP x CT	2,33333	12	
Comparação da extensão horizontal superior da lesão (ES total)			
BP x LT	2,00000	12	0,92004
MP x MT	2,08333	12	
AP x AT	1,91667	12	
Comparação da extensão horizontal inferior da lesão (EI total)			
BP LT	2,07500	20	0,13035
MP x MT	2,27500	20	
AP x CT	1,65000	20	
comparação do tecido de regeneração (Tec. reg.)			
BP x LT	1,27778	9	0,02778
MP x MT	2,27778	9	
AP x CT	2,44444	9	

Os gráficos a seguir mostram a evolução dos 3 parâmetros da tabela acima, para os quais o resultado do teste de Friedman foi significativo.

- Profundidade da cratera - gráfico 1
- Profundidade total da lesão - gráfico 2
- Tecido de regeneração - gráfico 3

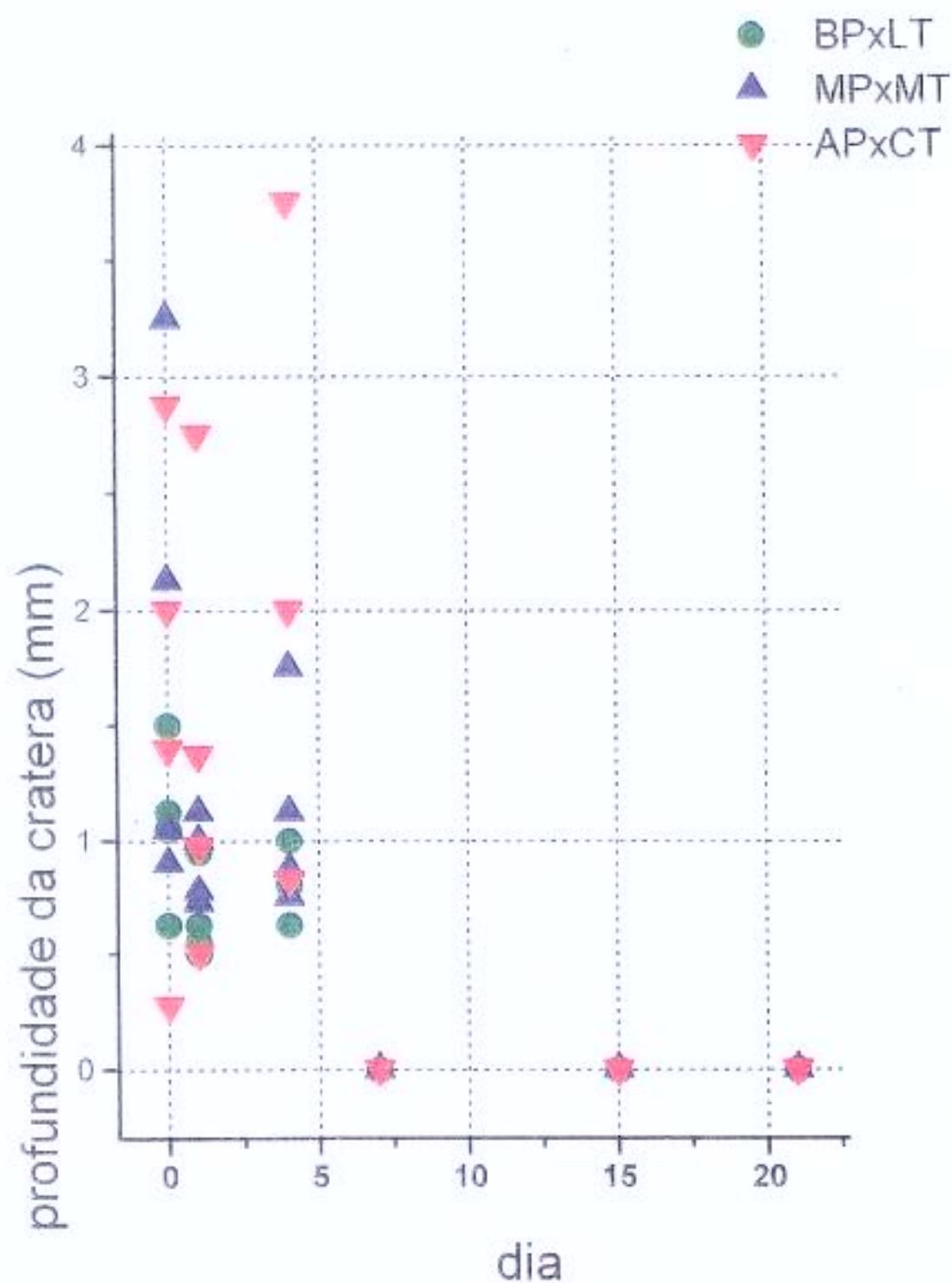


Gráfico 1: Profundidade da cratera medida em mm ao longo dos dias, durante a reparação tecidual.

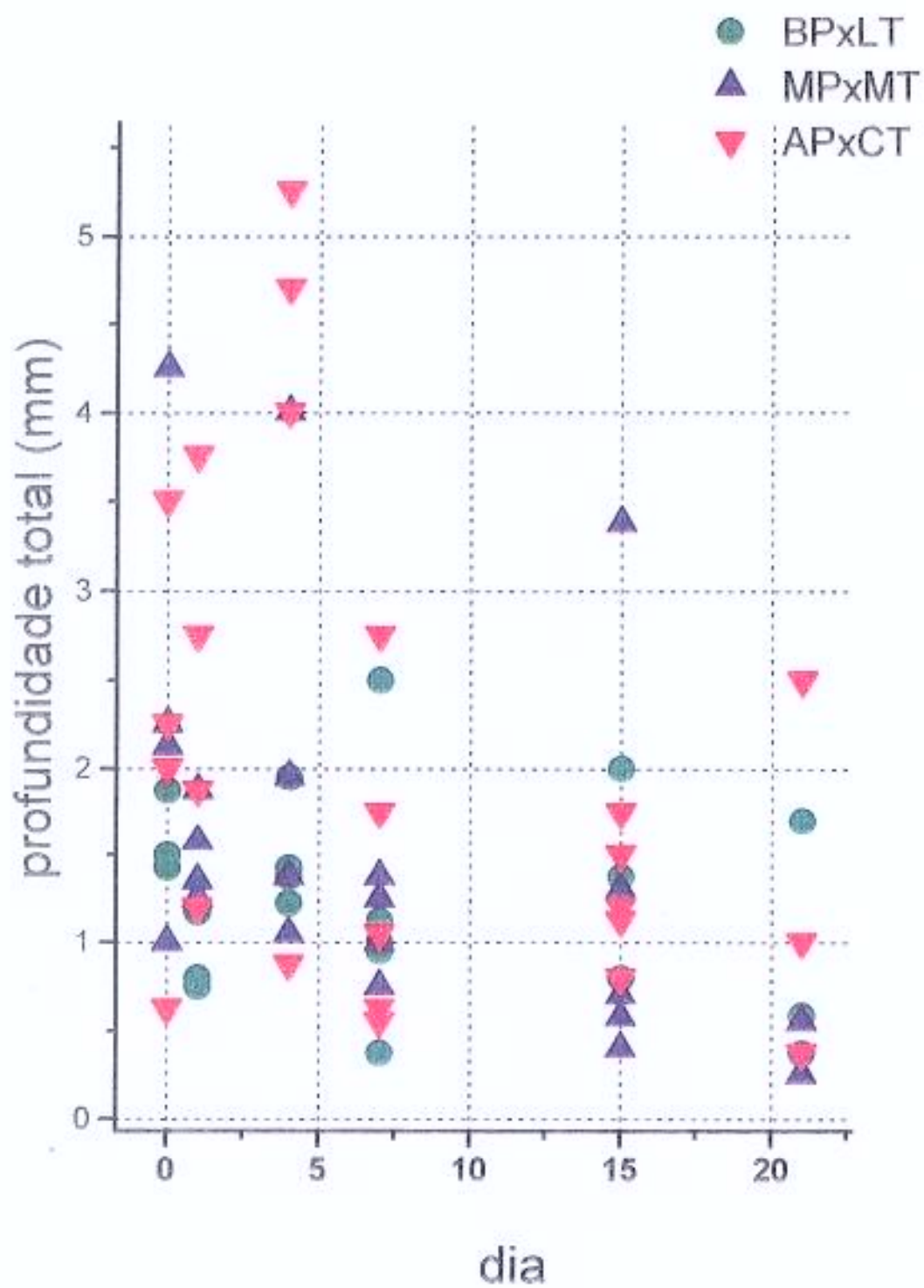


Gráfico 2. Profundidade total da lesão medida em mm ao longo dos dias durante o reparo tecidual.

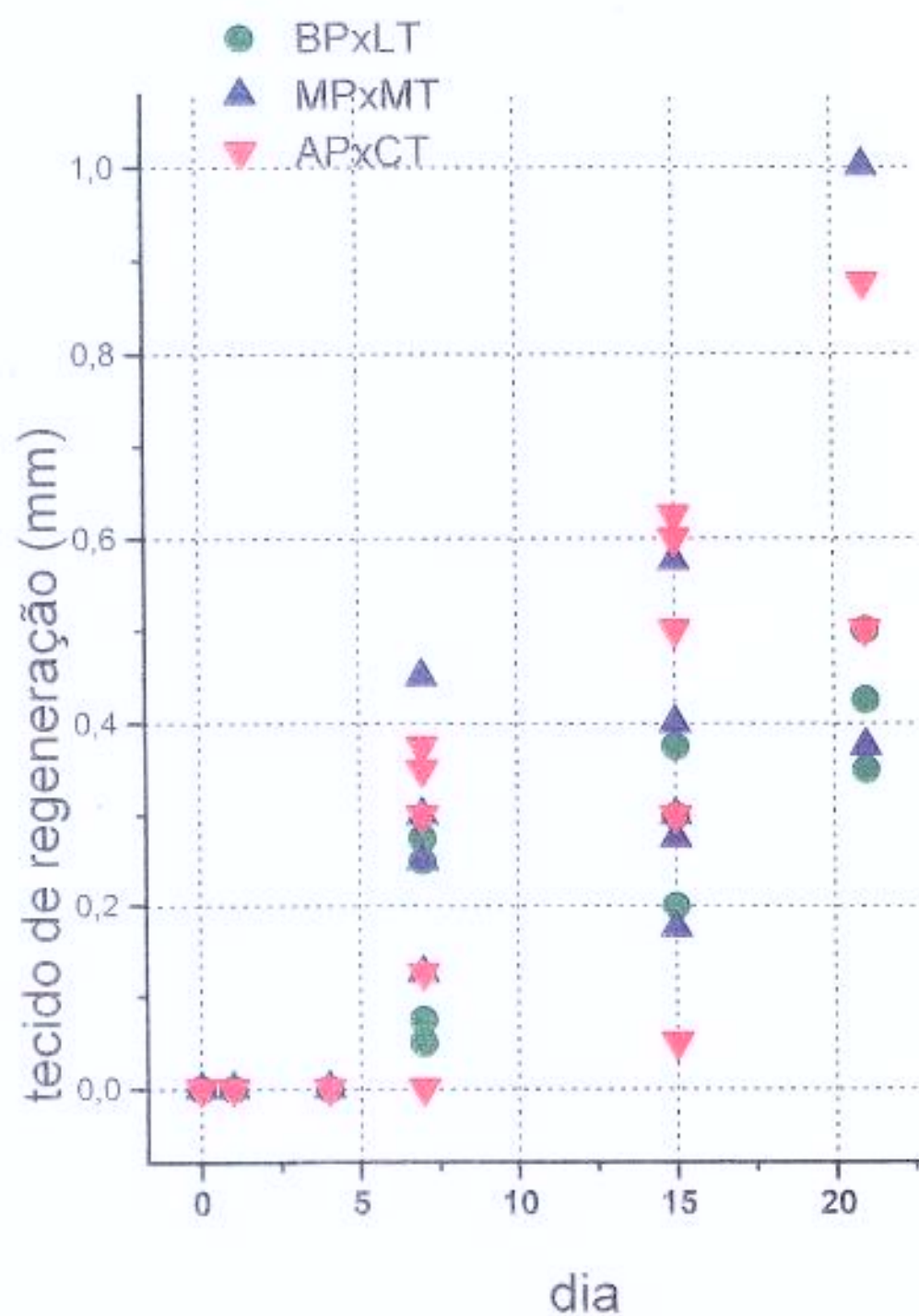


Gráfico 3: Tecido de regeneração medido em mm ao longo dos dias durante o reparo tecidual.

6. *DISCUSSÃO*

O laser de CO₂ mostrou excelentes resultados operatórios, confirmando a expectativa de ser um instrumento cirúrgico extremamente útil e que deve ser utilizado cada vez mais em diferentes procedimentos. O conhecimento de sua atuação no transoperatório e também o comportamento pós-operatório das lesões por ele produzidas determinam maior segurança para utilização em regiões mais delicadas, produzindo melhores resultados.

A espessura do músculo utilizado mostrou-se eficiente para comportar lesões profundas, determinadas pela utilização do laser com alta potência e curto tempo, solucionando a dificuldade anteriormente encontrada nas aplicações em pele de rato, conforme explicado em Material e Métodos do presente trabalho.

Encontramos algumas dificuldades em trabalho experimental com o músculo estriado, inerentes as suas próprias características. O deslizamento entre os feixes musculares, decorrente da fasciculação causada pela aplicação do pulso do laser CO₂, dificultou a padronização e interpretação das lesões, que apresentavam contornos bizarros, o que sempre foi mais evidente nas aplicações de AP x BT como já foi relatado anteriormente (DANIEL & STRICH, 1979). Este fenômeno está relacionado com a vaporização da água contida no tecido a qual, durante o seu desprendimento, acaba provocando um estímulo suficiente para produzir a fasciculação muscular. A movimentação determinada pelo deslizamento faz com que as lesões fiquem deformadas entre os fascículos. O fenômeno fica mais aparente em lesões recentes e durante a evolução do reparo tecidual é menos evidente. (foto 19).

Num tecido sem fibras contráteis, por exemplo a pele, não ocorre fasciculação e por isso as lesões são mais uniformes. (foto 20).

Todos os fatores citados acima contribuíram para dificultar a medida de algumas lesões que não estavam perfeitamente formadas.

Tentamos superar estas dificuldades examinando o material em cortes histológicos seriados, usando para o exame morfométrico somente os cortes com lesão mais profunda.



foto 19 - Lesão disforme ocasionada pelo deslizamento entre os fascículos musculares durante a utilização do laser CO2.



foto 20 - Lesão uniforme provocada pelo laser de CO2 em pele de porco.

A utilização do fragmento de plástico colocado entre a pele e o músculo foi fundamental para evitar os danos causados pela aderência formada durante o processo de reparação. Constatamos que não houve interferência desse elemento, que em nada modificou o reparo tecidual.

A utilização do anel espaçador garantiu uma distância focal definida e portanto a certeza de que todos os pontos de laser foram realizados na distância focal correta, e também de que a área de focalização foi mantida constante em todas as aplicações.

As medidas de potência realizadas pelo “powermeter”, precedendo sempre as aplicações, tiveram importância significativa no controle da estabilidade do laser.

O pedaço de acrílico transparente onde foi testado o laser, antes das aplicações *in vivo*, assegurava a manutenção da morfologia das lesões reproduzidas previamente neste material.

O fio de algodão 3-0 mostrou-se bastante resistente, evitando deiscência na sutura e infecção no local da aplicação.

Escolhemos como animal de experimentação o rato, por ser de fácil manuseio e de grande resistência a processos infecciosos. Em nosso estudo, o rebatimento e a reposição da pele não provocaram processo inflamatório importante nos músculos onde não aplicamos o laser, que serviram como controle, mesmo na ausência de antibioticoterapia. Além disso, os processos de regeneração e cicatrização no rato evoluem rapidamente, o que encurta o tempo de observação pós-operatória.

O laser CO₂ produz uma radiação com comprimento de onda (10,6µm), que é bem absorvida pelos tecidos biológicos em geral. A interação desta radiação infravermelha com aqueles tecidos se dá com grande eficiência de conversão em calor localizado, podendo este, assim, ser utilizado como um “bisturi cirúrgico”.

A energia térmica é responsável pelos seguintes efeitos:

A- efeitos no local da irradiação :

1. fator físico-mecânico: em níveis suficientemente altos de energia, a água contida em grande quantidade nas células sofre rápida vaporização, causando “explosões” destas e ejeção do componente sólido do tecido, o que explica a gênese da cratera (HALL *et al.*, 1971; MIHASHI *et al.*, 1976; TICHÝ *et al.*, 1988b; McKENZIE, 1990).
2. fator físico-químico: A desnaturação térmica das proteínas no centro da irradiação pode provocar carbonização.

Este efeito foi descrito em diferentes tecidos, como por exemplo : fígado, baço, pele, músculo esquelético, tecido adiposo e lobo de orelha. (MIHASHI *et al.*, 1976; TICHÝ *et al.*, 1987, 1988a,b,c; McKENZIE, 1990).

B- efeitos ao redor do local da aplicação do laser :

- a necrose ao redor da cratera é causada pela transmissão de calor e propagação do dano térmico às células vizinhas.

Após aplicação AP x CT, observamos menos tecido carbonizado nas bordas da cratera que nas produzidas com BP x LT . Obviamente, nas aplicações de AP x CT, o curto tempo em que a energia total é entregue ao tecido não permite a disseminação de calor suficiente para provocar carbonização nas proximidades da área atingida, sendo a alta potência ou grande quantidade de energia o fator responsável pela maior profundidade da cratera (McKENZIE, 1983; TICHÝ *et al.*, 1987, 1988a,b,c, THOMSEN, 1991; JACQUES, 1992).

Diferenças significativas não foram encontradas na observação do diâmetro total da borda das lesões, nos diferentes grupos. Isto pode ser explicado pelo fato de estarem os tempos utilizados para o presente trabalho (zero, 1 e 2 segundos), em termos absolutos, em uma mesma ordem de grandeza, não causando efeitos diferenciados de propagação imediata de calor na superfície do tecido.

Aplicamos o teste de Friedman que é mais adequado para comparação de amostras dependentes, em mais de 2 grupos, como é o caso do nosso trabalho, onde comparamos a reparação de lesões produzidas por AP x CT, MP x MT e BP x LT em um mesmo animal.

Nos sete testes estatísticos realizados existe a possibilidade do erro alfa, significando que alguns dos valores de "p" menores que 0,05 poderão representar resultados ao acaso. Para nos certificarmos de que não incorreríamos no erro alfa e que os resultados seriam realmente significativos, valorizamos somente os testes com "p" menor que 0,05 que também mostravam um crescimento dos postos médios entre a BP x LT e MP x MT e entre a MP x MT e AP x AT.

Representamos graficamente os resultados para os parâmetros onde os testes aplicados mostraram-se significativos.

O gráfico (1) referente à profundidade da cratera mostra a tendência de maior profundidade para as lesões obtidas com a aplicação de laser de CO₂ com AP x CT.

No gráfico (2) verificamos também que, para a AP x CT, a profundidade total da lesão mostra-se maior.

O gráfico (3), que representa a regeneração tecidual, mostra que há uma presença mais significativa de tecido regenerado para AP x CT.

O dano térmico do tecido muscular foi evidenciado pela homogeneização e intensificação da eosinofilia do citoplasma, bem como pelos vacúolos citoplasmáticos, imediatamente após a aplicação do laser, indicativos de necrose térmica.

As crateras foram preenchidas predominantemente por líquido intersticial. Chamou atenção a ausência de hematomas maiores, em função de vasos até 0,5 mm serem selados durante aplicação do laser CO₂ (NICOLA, 1984; NICOLA *et al.*, 1997).

A reação inflamatória demarcando as áreas de necrose nos primeiros dias foi semelhante em todos os grupos.

Após quatro dias, já se percebe o início do processo reparativo com presença de tecido de granulação jovem e mioblastos e as lesões mostram diferenças na evolução do reparo.

A regeneração encontra-se mais avançada em AP x CT, onde podem ser vistos muitos mioblastos, poucos restos de tecido carbonizado, menos tecido de granulação e, conseqüentemente, escassa fibrose.

Passados 15 dias, é possível perceber que a regeneração muscular na AP x CT supera a BP x LT, com mioblastos mais evoluídos, apresentando diâmetros próximos à fibra muscular madura e núcleos mais voltados para a periferia da mesma (foto 21a e 21b).

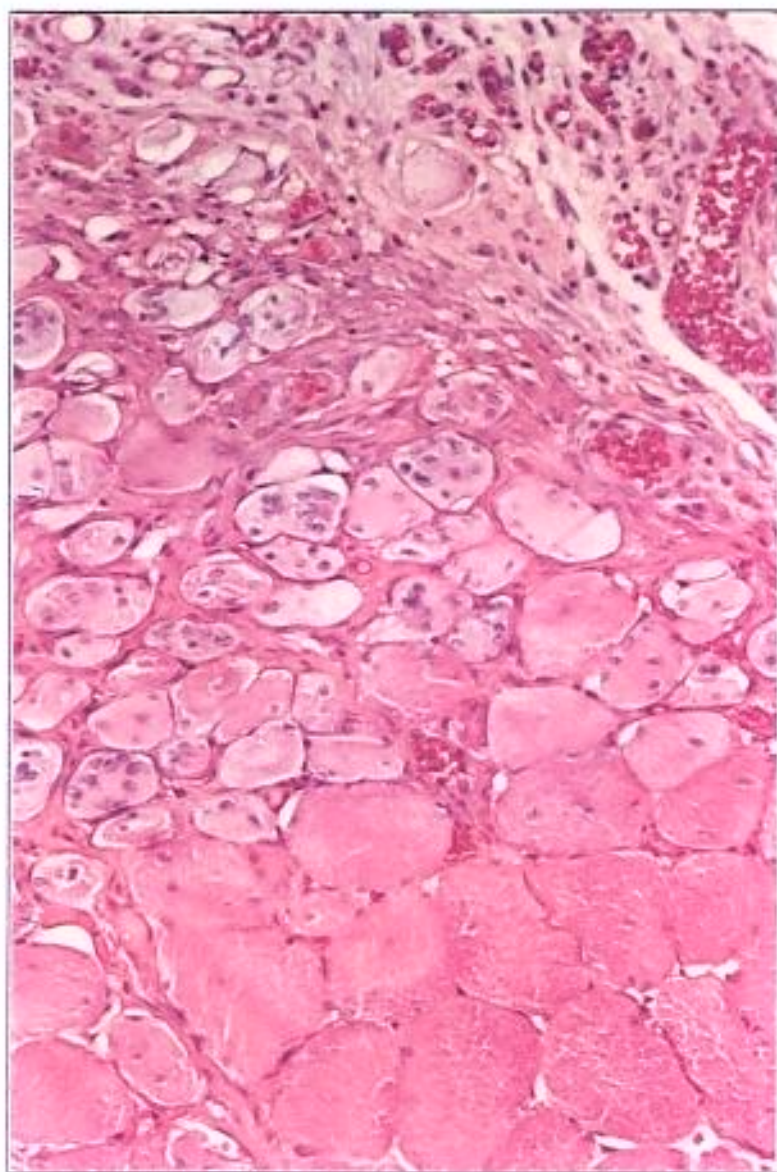


foto 21a – Aspecto microscópico da regeneração muscular com AP x CT com 15 dias após a aplicação de laser CO2 (20W x 0,5s) com Objetiva – 20.

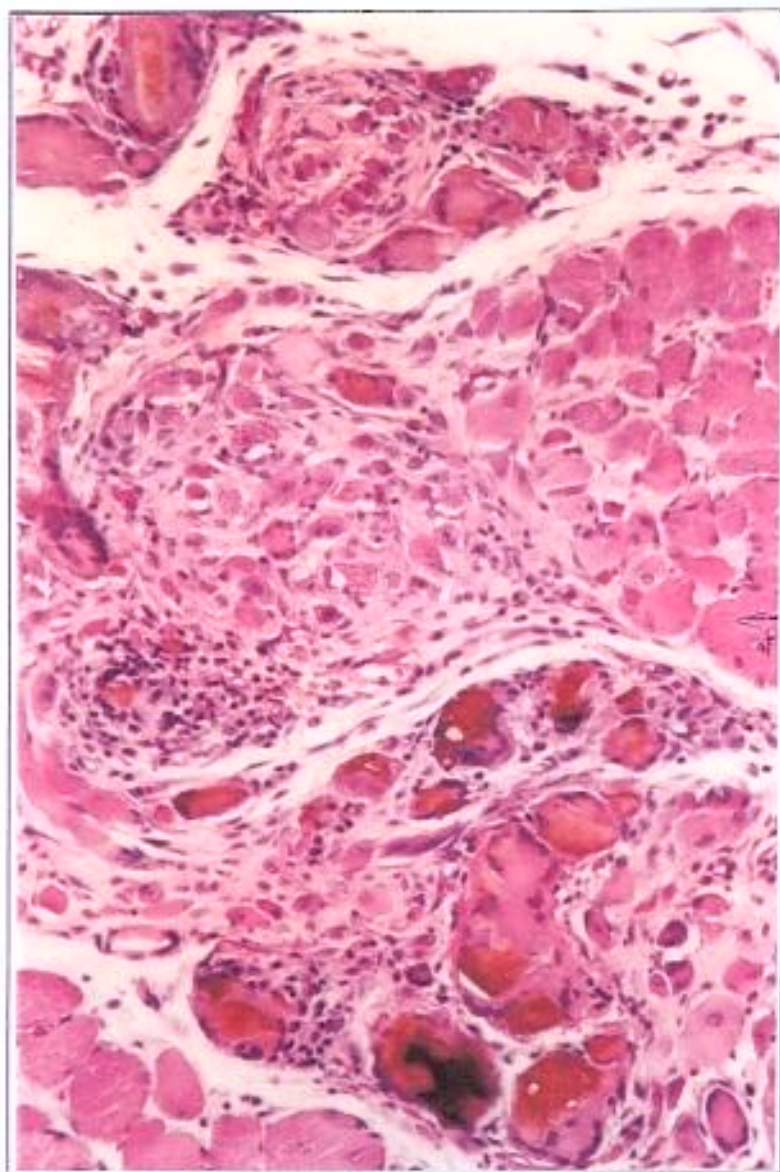


foto 21b – Aspecto microscópico da regeneração muscular com BP x LT com 15 dias após a aplicação de laser CO2 (05W x 2,0s) com Objetiva – 20.

Observar regeneração do tecido muscular mais avançado à esquerda

Após 21 dias, com AP x CT, praticamente todo tecido necrótico é substituído por tecido muscular maduro e a fibrose é mínima. Verifica-se claramente que, nesta situação, o processo de regeneração e a maturidade do tecido progrediram muito mais que na BP x LT (foto 22a e 22b).

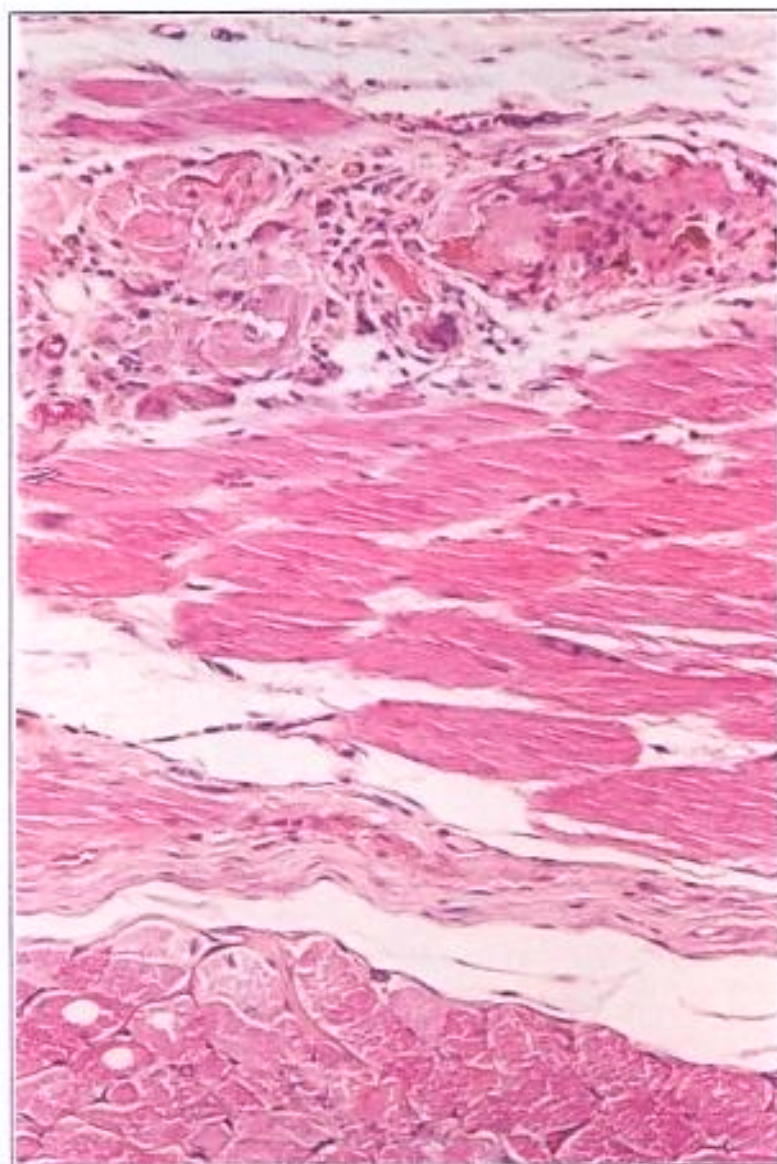


foto 22a – Aspecto microscópico da regeneração muscular com AP x CT com 21 dias após a aplicação de laser CO₂ (20W x 0,5s), com Objetiva – 20.

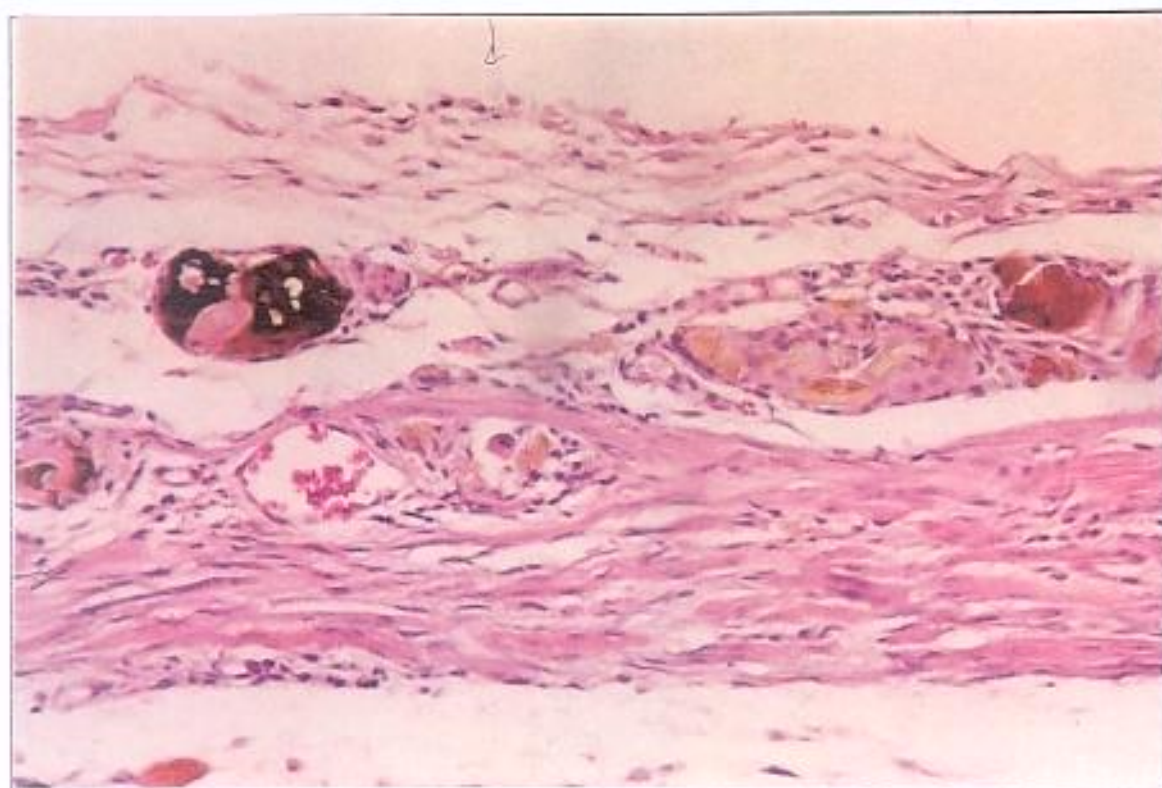


foto 22b – Aspecto microscópico da regeneração muscular com BP x CT com 21 dias após a aplicação de laser CO2 (05W x 2,0s) com Objetiva – 20.

Observar na foto 22a, a presença de maior número de granuloma do tipo corpo estranho.

7. CONCLUSÃO

Mostramos que o ponto principal das diferenças no processo da regeneração e cicatrização é a quantidade de tecido carbonizado presente no local das crateras. Notamos que nas lesões com mais fragmentos carbonizados havia um maior número de granulomas do tipo corpo estranho, com células gigantes multinucleadas e fibrose mais intensa. O processo da reação de corpo estranho obviamente retarda a regeneração das fibras musculares, com evidente crescimento mais lento, em comparação com as fibras regenerativas nas lesões obtidas com alta potência e curto tempo.

Outras observações que merecem destaque são:

- 1- A cratera causada pela aplicação de alta potência e curto tempo é mais profunda e contém menos tecido carbonizado nas margens.
- 2- Durante a reparação do dano, as lesões causadas por alta potência e curto tempo mostram menos fibrose e um menor número de granulomas do tipo corpo estranho em relação a baixa potência e curto tempo.
- 3- O processo de regeneração muscular é mais intenso nas lesões oriundas da aplicação de pulsos de laser de alta potência e curto tempo, evoluindo mais rapidamente e do ponto de vista qualitativo apresenta-se superior à regeneração de lesões obtidas com baixa potência e longo tempo.

Em analogia aos princípios gerais da reparação de tecido após intervenção cirúrgica podemos considerar:

- 4- O processo de reparação, após a aplicação de pulsos de laser baixa potência e longo tempo é semelhante ao reparo por segunda intenção, tendo em vista a perda de maior volume de tecido, vaporizado, entre as bordas da lesão.
- 5- O processo de reparação de lesões causadas por pulsos de laser de alta potência e curto tempo assemelha-se ao reparo por primeira intenção, considerando a proximidade entre as bordas da lesão e o menor volume de tecido vaporizado por esta forma de aplicação

Após as considerações acima mencionadas, podemos concluir que o conceito vigente na literatura, de que a utilização de pulsos de alta potência e curto tempo levam a um menor dano, coincide com os resultados encontrados em nosso trabalho.

8. *SUMMARY*

The aim of our study was to compare biologic effects such as tissue damage and regeneration in rat skeletal muscle after CO₂ laser application with pulses of constant energy density, but with varying power and exposure time.

We used three different laser conditions: 20W x 0.5s, 10W x 1.0s and 5.0 W x 2.0s, all having the same energy density (10 joules in a constant area).

The animals were sacrificed immediately after laser application, and after 1, 4, 7, 15 and 21 days. Tissue damage produced by the CO₂ laser with high power provokes more profound craters with less tissue damage at the margins, as shown by lesser tissue carbonization, fewer foreign body giant cell granulomas and less tissue fibrosis and, on the other hand, an accelerated regeneration of muscle tissue.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, W.A.D.; SCOTTI, T.M.: Inflamação, Hipersensibilidade, Reparo e Transplante. In: _____ **Sinopse de Patologia**. 2 ed. Rio de Janeiro, Cultura Médica Ltda., 1976. p.61-93.
- BELLINA, J.H.; HEMMINGS, R.; VOROS, J.I.; ROSS, L.F.- Carbon dioxide laser and electrosurgical wound study with an animal model: a comparison of tissue damage and healing patterns in peritoneal tissue. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, 148: 327-34, 1984.
- BELLINA, J.H.; FICK, A.C.; JACKON, J.D.- Laser in Gynecology: an historical/developmental overview. **Lasers Surg. Med.**, 5: 1-22, 1985.
- BEVILACQUA, R.G.; CHAPCHAP, P.; ALMEIDA, C.G.- Cicatrização. In: ALLGÖWER, M. & BEVILACQUA, R.G. - **Manual de Cirurgia**. 2 ed. São Paulo, Editorial Pedagógica, 1981.
- BOGLIOLO, L.; PEREIRA, F. E.L.- Inflamações. In: BOGLIOLO, L.; LOPES, E.R.; CHAPADEIRO, E.; RASO, P.; TAFURI, W.L - **Patologia**. 4 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1987.p.67-112.
- COCHRANE, J.P.S.; BEACON, G.H.; CREASEY, G.H.; RUSSELL, C.G.- Wound healing after laser surgery: an experimental study. **Brit. J. Surg.**, 67: 740-3, 1980.
- COUTINHO, A.A.; NICOLA, E.M.D.; NICOLA, J.H. - Advantages in the use of CO₂ laser for gingival hyperplasia removal. In: WORLD CONGRESS ON MEDICAL PHYSICS, 10 AND BIOMEDICAL ENGINEERING, 27, Rio de Janeiro, 1994. **Abstracts**. Rio de Janeiro, Organizing Committee of the World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering 1994a. v.1, p.141 (Abstract, 1.6)

COUTINHO, A.A.; NICOLA, J.H.; NICOLA, E.M.D. - Relation between cicatricial evolution of skin lesions and the extent of tissue damage during CO2 laser application. In: **WORLD CONGRESS ON MEDICAL PHYSICS, 10 AND BIOMEDICAL ENGINEERING**, 27, Rio de Janeiro, 1994. **Abstracts**. Rio de Janeiro, Organizing Committee of the World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering 1994b. v.1, p.155 (Abstract, 2.1)

DANIEL, P.M. & STRICH, S.J.- Skeletal muscle. In:_____ **Systemic Patol.** 5 ed., London, Churchill Livingstone, 1979. p. 2350-5 v.5.

DUNPHY, J.E.- On the nature and care of wounds. **Annals Of The Royal College Of Surgeons of England** 69-87, fev. 1960.

ECKERSLEY, J.R.T. & DUDLEY, H.A.F.- Wounds and wound healing. **Brit. Med. Bull.**, **44**: (2), 423-36, 1988.

EDWARDS, L.C. & DUNPHY, J.E.- Wound healing: 1- injury and normal repair. **N. Engl. J. Med.**, **5**: 224-33, 1958.

EISBERG, R. & RESNICK, R. - O laser. In:_____ **Física Quântica**. Rio de Janeiro, Campos, 1979. p.499- 505.

ENQUIST, I. F.- Princípios da Cicatrização das Feridas. In: DAVIS, L. - **Clínica Cirúrgica**. 2 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1970. p.22-32.

FAGUNDES, J. J. - Estudo comparativo da cicatrização de anastomoses cólicas realizadas com o auxílio do bisturi elétrico e do bisturi "laser" de dióxido de carbono - trabalho experimental em cães. Campinas, 1990. (Tese - Doutorado Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas)

- GOLDENBERG, S.; MINCIS, M.; FRANÇA, L.C.M.; GOMES P.O., GOLDENBERG, A.
- Estudio comparativo entre el efecto del rayo láser CO2 y el bisturí en la cicatrización gástrica en los perros. **Rev. Esp. Enf. Ap. Digest.**, 59: 79-92, 1981.
- GOLDENBERG, S. - O raio laser de CO2 em cirurgias do aparelho digestivo. **Rev. Col. Bras. Cir.**, 13: 183-4, 1986. [Editorial]
- GOLDMAN, L. & ROCKWELL, R.J.Jr.- **Laser In Medicine**. 14 ed. New York Gordon and Breach, Science Publishers, 1971. p. 385.
- GONÇALVES, E.L.- Ferimentos das Partes Moles e Cicatrização. In: Goffi, F.S., **Técnicas Cirúrgicas**, 3 ed. São Paulo, Livraria Ateneu, 1988. p.207-17. v.1.
- HALL, R.R.- The healing of tissue incised by a carbon dioxide laser. **Brit. J. Surg.**, 58: 222-5, 1971.
- HALL, R.R.; BEACH, A.D.; BAKER, E.; MORISON, P.C.A.- Incision of tissue by carbon dioxide laser. **Nature**, 232: 131-2, 1971.
- HAM, A.W. & CORMAK, D.H.. - Tecido Muscular. In: _____ **Histologia**. 8 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1983. p. 508-43.
- HAMMAR, H.- Wound healing. **Internat. J. Dermatol.**, 32: 6-15, 1993.
- HARDY, M.A.- The biology of scar formation. **Phys. Therapy**, 69: 1014-24, 1989.
- HUNT, T.K.- The physiology of wound healing. **Ann. Emerg. Med.**, 17: 1265-1273, 1988.
- JACQUES, S.L.- Laser-tissue interactions: photochemical, photothermal and photomechanical. **Surg. Clin. North Am.**, 72: 531-58, 1992.

- JAIN, K.K. - Laser in neurosurgery: a review. **Lasers Surg. Med.**, **2**: 217-30, 1983.
- JUNQUEIRA, L.C. & CARNEIRO, J.- **Histologia Básica** 4 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1979. 394p.
- JUNQUEIRA, S.L.M.; PINOTTI, M.; NICOLA, E.M.D. - Temperature measurements during laser irradiation in living tissue., 19 In: WORLD CONGRESS ON MEDICAL PHYSICS, 10 AND BIOMEDICAL ENGINEERING, 27, Rio de Janeiro, 1994. **Abstracts**. Rio de Janeiro, Organizing Committee of the World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering 1994. v.1, p.141 (Abstract, 1.7)
- KAMAT, B.R.; CARNEY, J.M.; ARNDT, K.A.; STERN, R.S.; ROSEN, S.- Cutaneous tissue repair following CO₂ laser irradiation. **J. Invest. Dermatol.**, **87**: 268-71, 1986.
- KUHL, I.A. & KUHL, G - Obstrução aguda da laringe. **Clin. Ped.**, **1**: 30-5, 1977.
- KUHL, I.A.; MALINSKY, A.; FERNANDES, H.J. - Tratamento da papilomatose laríngea com raios laser. Comunicação interna. Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 1977.
- LIMA, E.J.; NICOLA, J.H.; NICOLA E.M.D. - Desenvolvimento de um laser de dióxido de carbono para uso em microcirurgias: estudo experimental em mucosa oral de cobaia. **Anais do I Simpósio Estadual sobre Lasers e aplicações**. Campinas, S.P., 1983.
- LUCIANO, A.A.; WHITMAN, G.; MAIER, D.B.M.; RANDOLPH, J.; MAENZA, R. - A comparison of thermal injury, healing patterns, and postoperative adhesion formation following CO₂ laser and electromicrosurgery. **Fertil. Steril.**, **48**: 1025-9, 1987.
- LUOMANEN, M.; MEURMAN, J.H., LETHO V.P. - Extracellular matrix in healing CO₂ laser incision wound. **J. Oral. Pathol.**, **16**: 322-31, 1987.

- MASTAGLIA, F.L. & WALTON, S.J.- Patological reactions. In: _____ **Skeletal Muscle Pathology**. London, Churchill Livingstone, 1982. p. 88-139.
- McKENZIE, A.L. - How far does thermal damage extend beneath the surface of CO₂ laser incisions? **Phys. Med. Biol.**, **28**: 905-12, 1983.
- McKENZIE, A.L. - Physics of thermal processes in laser-tissue interaction. **Phys. Med. Biol.**, **35**: 1175-1209, 1990.
- MEDAWAR, P.B.- Biological aspects of the repair process. **Brit. Med. Bull.**, **3**: 70-3, 1945.
- MEYERS, A.D.- Lasers and wound healing. **Arch. Otolaryngol Head Neck Surg.**, **116**: 1128, 1990.
- MIHASHI, S.; JAKO, G.J.; STRONG, M.S.- Laser surgery in otolaryngology: interaction of CO₂ laser and soft tissue. **Ann. NY Acad. Sci.**, **267**: 263-94, 1976.
- NICOLA, E.M.D.; TREVISAN, M.A.S.; LIMA, E.J.; MELLO, R. R. G.; NICOLA, J.H. - Desempenho de um laser de CO₂ nacional para uso em cirurgias otorrinolaringológicas. **Rev. Bras. Otorrinolaringol.**, **47**: 59-71, 1981.
- NICOLA, E.M.D. - Caracterização de micro lesões produzidas por laser CO₂ na mucosa oral de cães, em função da variação de parâmetros intrínsecos do equipamento. Campinas - S.P., 1984. (Tese - Doutorado - Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas)
- NICOLA, E.M.D.; ABREU, E.M.; GUSMÃO, R.J.; COUTINHO, A.A. - Comparative study between conventional surgery and CO₂ laser surgery in gingival hyperplasia. In: SPIE'S INTERNATIONAL SYMPOSIA OE/LASE'94, Los Angeles, 1994. **Proceedings**. Los Angeles, SPIE, 1994a. v.2128, p.386-8.

- NICOLA, E.M.D.; JUNQUEIRA, S.L.M.; BUSATO, M.S. - Experimental model to measure the increase of dental pulp temperature in vivo during laser application. In: SPIE'S INTERNATIONAL SYMPOSIA OE/LASE'94, Los Angeles, 1994. **Proceedings**. Los Angeles, SPIE, 1994b. v.2128, p.373-6.
- NICOLA, E.M.D.; COUTINHO, A.A.; NICOLA J.H.; GUSMÃO, R.J. - Syntomatic hemangioma of oral cavity treated with CO2 laser. In: SPIE'S INTERNATIONAL SYMPOSIA OE/LASE'95, San Jose, 1995. **Proceedings**. San Jose, SPIE, 1995. v.2395, p.189-95.
- NICOLA, E.M.D.; NICOLA, H.J.; GUSMÃO, R.J.; COUTINHO, A.A.; CASSITAS, N. - Minimal invasive method to treat hemangiomas of the oral cavity with CO2 laser. In: SPIE'S INTERNATIONAL SYMPOSIA OE/LASE'97, San Jose, 1997. **Proceedings**. San Jose, SPIE, 1997. v.2973, p.189-96.
- OSSOFF, R.H.; GONZALES, D.A.; WERKHAVEN, J.A. - New Horizons for Laser Research in Otolaryngology. In: _____ **The Laser Guidebook**. New York, McGraw Hill, 1986. p.1-37.
- PAOLA, D.; FISZMAN, P.; DUARTE, F.- Agressão. Resposta à Agressão. Mediadores Químicos da Resposta Inflamatória. In: PAOLA, D. - **Mecanismo Básicos De Doença**. São Paulo, Ateneu, 1977. p.43-74.
- PARTOVI, F.; IZATT J.A.; COTHREN, R.M.; KITTRELL, C.; THOMAS, J.E.; STRIKWERDA, S.; KRAMER, J.R.; FELD, M.S.- A model for thermal ablation of biological tissue using laser radiation. **Lasers Surg. Med.**, 7: 141-54, 1987.
- POLANYI, T.G. - Laser physics. **Otolaryngol. Clin. North Am.**, 16 : 753- 84, 1983.

- RADER, J.S.; REST, E.B.; FARMER, E.R.; ROSENSHEIN, N.B.: A comparison of wound healing after epithelial resection by ultrasonic surgical aspiration and ablation by the carbon dioxide laser. **Gynecol. Oncol.**, **46**: 351-6, 1992.
- ROBINS, S.L.; COTRAN, R.S.; KUMAR, V. - **Patologia Estrutural e Funcional**. 3 ed. Rio de Janeiro, Guanabara, 1986. 1404p.
- SCHRÖDER, T.; HUKKI, J.; CASTREN, M.; PUOLAKKAINEN, P.; LIPASTI, J. - Comparison of surgical lasers and conventional methods in skin incisions. **Scand. J. Reconstr. Surg.**, **23**: 187-90, 1989.
- SILVER, I.A. - The physiology of wound healing. **Schweizerische Rundschau fuer Medizin Praxis.**, **31**: 942-5, 1984.
- THOMSEN, S. - Pathologic analysis of photothermal and photomechanical effects of laser-tissue interactions. **Photochem. Photobiol.**, **53**: 825-35, 1991.
- TICHÝ, M.; JANSÁ, P.; HUBÁČEK, J.; TICHÁ, V.- Histological picture of the healing of CO₂ laser wound. **Acta Univ. Palacki. Olomuc.**, **116**: 207-14, 1987.
- TICHÝ, M.; JANSÁ, P.; HUBÁČEK, J.; TICHÁ, V.- Healing of experimental laser wound in liver and spleen. **Acta Univ. Palacki. Olomuc.**, **120**: 161-8, 1988a.
- TICHÝ, M.; JANSÁ, P.; HUBÁČEK, J.; TICHÁ, V.- Healing of experimental laser wound in the skin and auricle. **Acta Univ. Palacki. Olomuc.**, **120**: 169-78, 1988b.
- TICHÝ, M.; JANSÁ, P.; HUBÁČEK, J.; TICHÁ, V.- Healing of experimental laser wound in striated muscle and adipose tissue. **Acta Univ. Palacki. Olomuc.**, **120**: 179-87, 1988c.

BIBLIOGRAFIA

- ARMITAGE P. & BERRY G.-**Statistical Methods in Medical Research**. 3 ed.
Cambridge, Blackwell Science, 1994.
- BAKER, H. J.; LINDSEY, J. R.; WEISBROTH, S. H. - **The Laboratory Rat**. London,
Academic, 1979.
- BUENO F. S. **Dicionário Escrita da Língua Portuguesa** - 8 ed. FENAME (MEC)
- FERREIRA, A. B. H. - **Novo Dicionário da Língua Portuguesa** - 2 ed. - Rio de Janeiro,
Nova Fronteira S.A., 1986.
- HEBEL, R. & STROMBRG, M. W: - **Anatomy of the Laboratory Rat**. Baltimore,
Williams & Wilkins Company, 1979.
- KALMIA CO INC. **Programa WINSTAT 3.1** - Estados Unidos.
- NASCENTES, A. **Dicionário da Língua Portuguesa da Academia Brasileira de Letras**. Rio
de Janeiro, Bloch S. A., 1988.
- STEDMAN - **Dicionário Médico** -25 ed. - Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1996.
- WAYNFORTH, H. B.: **Experimental and Surgical Techique in the Rat**. London,
Academic 1980.

10. ANEXO

Nesta região aplicaram-se diversos conjuntos de pontos de laser, variando os parâmetros potência e tempo, sempre mantendo constante a energia final, com a finalidade de encontrar as melhores condições de operação. O objetivo era obter lesões com características morfológicas distintas entre si, para poder comparar os comportamentos durante a evolução cicatricial. Sabe-se que potências elevadas aplicadas em curto tempo determinam lesões mais profundas, verticalizadas, com menos dano tecidual circunvizinho, enquanto potências baixas, aplicadas durante maior tempo, geram lesões mais rasas, horizontalizadas e com maior dano (NICOLA, 1984).

Chegou-se ao seguinte conjunto de combinações:

$$10\text{W} \times 0,1 \text{ ms.} = 1,0 \text{ J;}$$

$$05\text{W} \times 0,2 \text{ ms.} = 1,0\text{J;}$$

$$02\text{W} \times 0,5 \text{ ms.} = 1,0\text{J.}$$

Fizemos a aplicação de 2 conjuntos de três pontos com a combinação acima, em 8 ratos, totalizando 4 lotes com 2 animais, e retiramos os fragmentos de pele imediatamente, após 7 dias, de um animal e 14 e 21 dias, do outro. Trabalhamos na ressecção dos 4 fragmentos de pele de cada situação, colocando-os a seguir em formol a 10% e, posteriormente, enviando-os ao Laboratório de Anatomia Patológica do Núcleo de Medicina Experimental da F.C.M. - UNICAMP, para processamento. Os fragmentos foram então incluídos em blocos de parafina, os três pontos juntos; foram feitos cortes seriados, colocados em 5 lâminas cada e corados com H/E. Fizemos análise, sob microscopia óptica, de um total de 80 lâminas, encontrando resultados significativos, semelhantes àqueles obtidos por HALL (1971). Nossos resultados motivaram a realização de um trabalho apresentado na forma de pôster, em Congresso (COUTINHO *et al.*, 1994b).

Ainda assim foram encontradas algumas dificuldades:

- o espaço de uma semana entre a primeira análise e a segunda foi muito longo, perdendo-se dados importantes. Então, decidimos analisar também a reparação após 1 e 4 dias;

- a espessura delgada da pele do rato era, muitas vezes, ultrapassada pelas lesões decorrentes da aplicação, de potências mais elevadas, de laser CO2. Para solucionar este problema, que dificultava a análise das lesões, testamos e optamos pela utilização do par de músculos *gluteus maximus*, com espessura suficiente para comportá-las.

Fizemos, então aplicações para testar o comportamento do tecido com o qual começávamos a trabalhar o músculo. Para aplicação dos pontos, a pele da região lombar dorsal foi rebatida sobre a musculatura, de forma que ficasse uma janela expondo totalmente o par de músculos. Aplicou-se um conjunto de 6 pontos em cada músculo, totalizando 12 pontos por rato. Após a aplicação, a pele era recolocada de volta e suturada com fio de algodão 3-0. Nos primeiros animais verificamos que a pele aderida às lesões, no decorrer do processo de reparação. A ressecção dos músculos aderidos à pele acarretava dano às lesões, comprometendo-as e prejudicando o resultado final. Este problema foi solucionado através da colocação de um fragmento de plástico estéril, da própria embalagem do fio de sutura, que se mostrou bastante satisfatório, preservando as lesões. Utilizamos 12 ratos divididos em 4 lotes com 3 animais, nos quais foram aplicados diferentes conjuntos de parâmetros de tempo e potência. Os músculos foram ressecados imediatamente e após 3 e 7 dias. Utilizamos o mesmo método para manufatura das lâminas: foram 30 por rato, (lote de 12), totalizando 360 lâminas. Optamos pelo seguinte conjunto:

$$05 \text{ W} \times 2,0 \text{ seg.} = 10 \text{ J}$$

$$10 \text{ W} \times 1,0 \text{ seg.} = 10$$

$$20 \text{ W} \times 0,5 \text{ seg.} = 10 \text{ J}$$

Todo este estudo inicial serviu de piloto para que fossem solucionadas algumas dificuldades e fosse atingido o conjunto mais adequado de tecido x tempo x potência, com a definição da metodologia utilizada neste trabalho.

“Sejam quais forem os resultados, fiz o que pude”

Pasteur

Anexo 1

- Projeto piloto

As razões dispostas na metodologia justificam a mudança do tipo de tecido (de pele para músculo) que foi utilizado no presente estudo. Previamente desenvolvemos um trabalho piloto, em pele de rato, que contribuiu muito para elaboração da tese e será descrito a seguir:

Os ratos foram anestesiados e fixados em posição ventral e os pelos da região dorsal do pescoço tricotomizados previamente, com máquina elétrica. Esta região foi escolhida por ser considerada um local de mais difícil manipulação para o rato e, portanto, menos sujeita a traumas (foto 23).



Foto 23: Aplicação do laser CO2 em pele de rato