

Estudo comparativo das alterações histológicas imediatas causadas pelo uso do *laser* de CO₂ e do *laser* de *erbium* na pele de ratos wistar

Comparative study of histopathological abnormalities induced by CO₂ and erbium laser on the skin of wistar rats

Lúcia de Noronha¹
Ricardo Teles Schulz²
Vanessa Dello Monaco Martins³
André Auersvald⁴
Ruth Graf⁴

unitermos

Laser CO₂
Laser erbium
Pele

resumo

O presente estudo tem como objetivo analisar, do ponto de vista anatomopatológico, os efeitos térmicos encontrados na pele de ratos wistar após a aplicação do *laser* de CO₂ e do *laser* *erbium*. Utilizaram-se oito ratos submetidos a tricotomia em toda a região toracodorsal. Selecionaram-se duas áreas separadas, as quais receberam a aplicação do *laser*. Na primeira foram realizadas duas passadas do *laser* de CO₂ e na segunda, duas passadas do *laser* *erbium*. A área-controle correspondeu àquela imediatamente adjacente à área submetida ao *laser*. A análise microscópica da lesão causada pelo *laser* de CO₂ revela lesão em forma de U, com ablação completa da epiderme em toda a sua extensão. A derme superficial apresenta degeneração do colágeno, correspondendo ao dano térmico residual, e a transição deste para a derme normal é bem demarcada. Na pele lesada com *laser* *erbium* observa-se também extensa área de pele lesada em forma de platô, com algumas pequenas áreas de pele não-lesada. Pode-se observar, ainda, dano do colágeno na derme superficial, porém mais discreto que aquele causado pelo CO₂.

abstract

The aim of this paper is to analyse the histopathology of the thermal effects on the skin of Wistar rats after the application of CO₂ and erbium laser. Eight rats had their flanks shaved and two areas were selected for the use of the laser. The first area received two applications of CO₂ laser, and the second area two applications of the erbium laser. The skin adjacent to the laser application site was used as a control area. The microscopic analysis of the injury caused by CO₂ laser revealed a complete ablation of epidermis and an injury that looked like an "U" in shape. The superficial dermis presented a degeneration of the collagen that corresponded to the residual thermal injury, to normal dermis was sharply demarcated. The injury caused by erbium laser was observed as a plateau injured area with a few small normal areas. The collagen of the superficial dermis was also injured, however to a lesser degree as compared to CO₂ laser effect.

key words

CO₂ laser
Erbium laser
Skin

1. Professora assistente da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC/PR); mestre em Dermatopatologia.
2. Acadêmico do curso de Medicina e estagiário do Laboratório de Patologia Experimental da PUC/PR.
3. Acadêmica do curso de Medicina da Universidade Federal do Paraná.
4. Mestre em Cirurgia Plástica.

Introdução

A ciência básica dos sistemas a *laser* foi descrita em 1916, quando Einstein propôs sua teoria de “emissão de radiação” espontânea e estimulada. A primeira demonstração prática da utilização do *laser* ocorreu em 1954, por Gordon *et al.* (6), estimulando a emissão de radiação através do espectro eletromagnético.

A utilização do *laser* em cirurgia dermatológica tomou força com a publicação da teoria da fototermólise seletiva, em 1983, por Anderson *et al.* (3), em que existem dois componentes básicos, sendo que no primeiro o comprimento de onda determina especificamente a absorção da energia no tecido, e no segundo o tempo de exposição do pulso limita especificamente a difusão térmica no tecido tratado. A arte da fototermólise seletiva continua a se desenvolver dentro da ciência, conforme a física aplicada do *laser* se expande.

O *laser* está indicado em tratamento de rugas de face e pescoço, tratamento do fotoenvelhecimento facial, cicatrizes traumáticas de face, seqüelas de acne e ressecção de lesões cutâneas.

Desde a primeira descrição do uso de *laser* de dióxido de carbono (CO₂) para o rejuvenescimento facial, em 1985, a sua utilização tem sido efetiva e amplamente difundida no rejuvenescimento facial, devido à lesão térmica que provoca. O objetivo da fotoablação é remover uma camada mais superficial de pele, isto é, tecido epidérmico e derme superficial papilar que sofreram alterações degenerativas pela ação crônica dos raios solares.

Este estudo tem como objetivo analisar, do ponto de vista anatomopatológico, os efeitos térmicos encontrados na pele de ratos wistar após a aplicação do *laser* de CO₂ e do *laser* *erbium*.

Material e Métodos

Utilizaram-se oito animais (*Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia mammalia*) machos, adultos, entre 90 e 110 dias de vida, com peso entre 200g e 300g, da linhagem wistar, sem doenças prévias, procedentes do Tecpar – Instituto Tecnológico do Paraná.

Regulou-se o aparelho de *laser* CO₂ ultrapulsado (Ultrapulse 5000, Coherent Medical Lasers, Palo Alto, Califórnia, EUA) nos seguintes parâmetros: gerador de padrão computadorizado ativado; energia de 300mj; velocidade de 200pps; padrão quadrado; tamanho 9 (0,9cm²) e densidade 6 (ou sobreposição de 30%).

O aparelho de *laser* Erbium:YAG (ESC Medical Systems Ltd., Yokneam Industrial Park, Israel) foi regulado segundo os parâmetros: energia de 1,5J/p, padrão quadrado, tamanho 4, fluência de 21,42J/cm², sobreposição de 30%, tamanho do *spot* de 3mm, *rate* de 20pps.

Os animais foram mantidos vivos sob anestesia inalatória com éter sulfúrico, posicionados em decúbito ventral, sendo realizada a tricotomia em toda a região toracodorsal. Foram selecionadas duas áreas separadas de 1cm x 1cm, as quais receberam a aplicação do *laser*. Na primeira foram realizadas duas aplicações do *laser* de CO₂ e na segunda, duas aplicações do *laser* *erbium*. A área-controle correspondeu àquela imediatamente adjacente à área submetida ao *laser*.

O material foi ressecado em tiras de 1cm x 0,5cm, envolvendo no seu maior comprimento 0,5cm de pele não-tratada (pele-controle) e 0,5cm de pele submetida a fotoablação. Estes fragmentos retangulares de pele foram fixados em formalina a 10% e, após 72 horas, cada peça foi dividida longitudinalmente ao meio, produzindo-se, assim, quatro fragmentos de 1cm x 0,25cm para cada rato estudado, dois após o uso do *laser* de CO₂ e outros dois após o *laser* de *erbium*. O tempo decorrido entre a aplicação do *laser* e a fixação do material em formalina correspondeu a aproximadamente cinco minutos. Os fragmentos obtidos foram processados em autotécnico *overnight* e incluídos em parafina, certificando-se de que as faces dermoepidérmicas dos dois fragmentos ficassem voltadas para a face de corte do bloco.

As lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina (HE), orceína para melhor visualização das fibras elásticas e tricrômico de Gomori para visualização das fibras colágenas.

Todos os preparados histológicos foram observados em microscópio tetraocular American Optical, e as alterações histopatológicas foram documentadas em fotomicrografias. As fotomicrografias foram tomadas em microscópio trinocular Olympus BH2 acoplado à máquina fotográfica Olympus C-35DA-2.

Resultados

A análise histológica da pele-controle mostra uma epiderme apresentando camada córnea espessa, camada granulosa única, camada espinhosa composta por seis a oito estratos de células pavimentosas e camada basal com apenas uma única camada celular. A

membrana basal delicada limita inferiormente a epiderme e superiormente a derme, a qual apresenta poucas fibras elásticas e grande número de unidades pilosebáceas.

A análise microscópica da lesão causada pelo laser de CO₂ em todas as três colorações utilizadas (HE, tricrômico de Gomori e orceína) revela um dano de ablação em forma de U, com lesão da epiderme em toda a extensão da aplicação do laser, apresentando áreas de lesão mais intensa da derme na profundidade do U e áreas de menor lesão nas bordas da aplicação do laser de CO₂ (Figura 1). A lesão de ablação compreende toda a espessura da epiderme e parte da derme papilar. Este padrão provoca, portanto, toda uma extensão de pele submetida a ablação, porém com áreas de lesões variáveis, mais ou menos intensas (Figura 2).

Na pele lesada pelo laser erbium (Figura 3), o dano de ablação apresenta-se em forma característica de platô, com ablação completa da epiderme, e a derme apresenta uma lesão uniforme em toda a sua profundidade. Neste caso, a lesão compreende a epiderme e toda a derme papilar, além de pequena porção da derme reticular. No entanto, há intervalos de pele não-lesada ao longo da extensão da área onde aplicou-se o laser erbium (Figura 4).

Analisando-se o dano térmico residual (DTR) pelo laser de CO₂ e pelo laser de erbium, nas três colorações utilizadas, observa-se a perda da afinidade tintorial normal das fibras colágenas pelos corantes, além da demarcação de duas zonas: a zona de coagulação, mais superficial, na qual as fibras estão completamente lesadas; e a zona de transição, mais profunda, onde

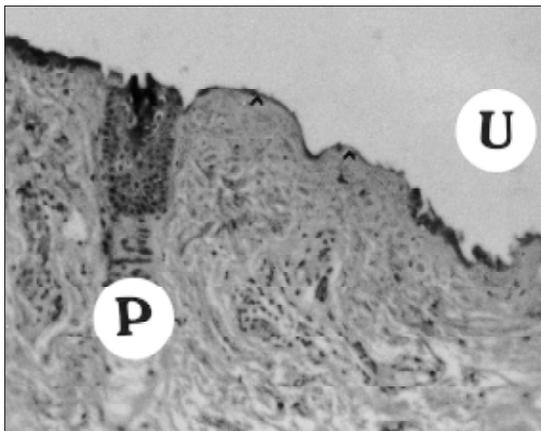


Figura 1 – Pele lesada pelo laser CO₂, observando-se ablação (U) completa da epiderme e porção da derme superficial, em forma de U, atingindo o infundíbulo piloso (P) (HE 40x)

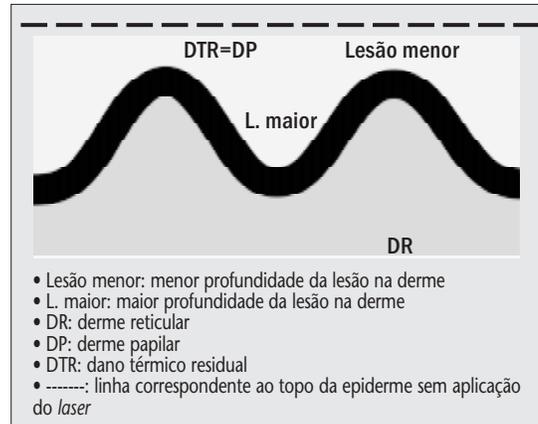


Figura 2 – Laser CO₂: ablação total da epiderme com áreas de lesão variável na derme, revelando um aspecto em forma de U. O dano térmico residual correspondeu à derme papilar apenas, sem alcançar a derme reticular

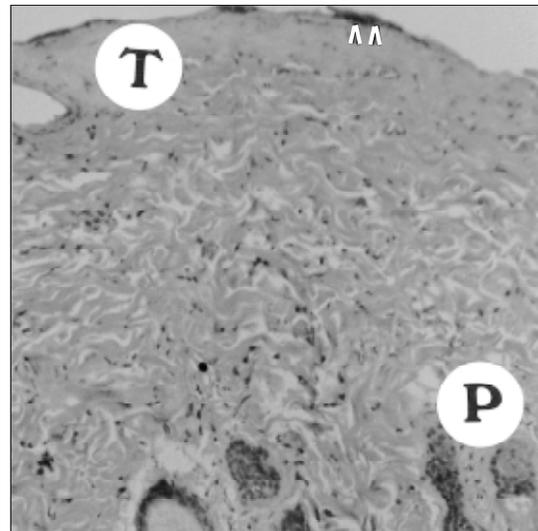


Figura 3 – Pele lesada pelo laser erbium, observando-se lesão em platô (T), com porções de epiderme não-lesada (setas) em meio às áreas lesadas (HE 40x)

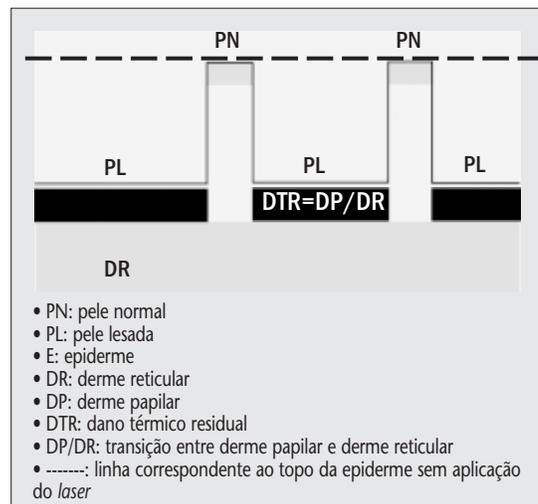


Figura 4 – Laser erbium: ablação uniforme de toda a epiderme e derme papilar no local de aplicação do laser, com dano térmico residual atingindo até a transição com a derme reticular. Ocorrem áreas não-lesionadas entre as áreas de aplicação do laser, revelando um aspecto em platô

há lesão apenas parcial das fibras colágenas. As fibras que apresentaram dano parcial apenas perderam a sua afinidade normal ao corante, enquanto as fibras colágenas que sofreram dano total também apresentaram uma modificação em sua morfologia, tornando-se amorfas. O *laser* de CO₂ apresenta um DTR maior que aquele observado no *laser erbium*, com zonas de coagulação e de transição profundas e espessas. Já o *laser erbium* apresenta uma zona de coagulação mais delicada e uma zona de transição muito semelhante em espessura àquela causada pelo *laser* de CO₂ (Figuras 5 e 6).

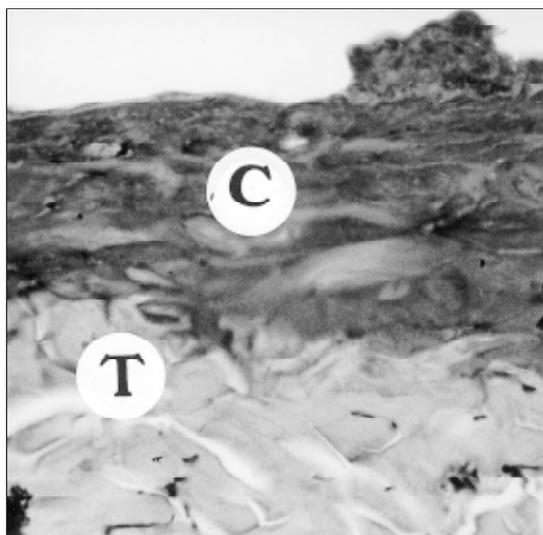


Figura 5 – Pele lesionada pelo *laser* CO₂, onde se observa uma zona de coagulação (C) espessa, correspondendo ao dano térmico residual, e uma zona de transição (T) também espessa (tricolor de Gomori 400x)

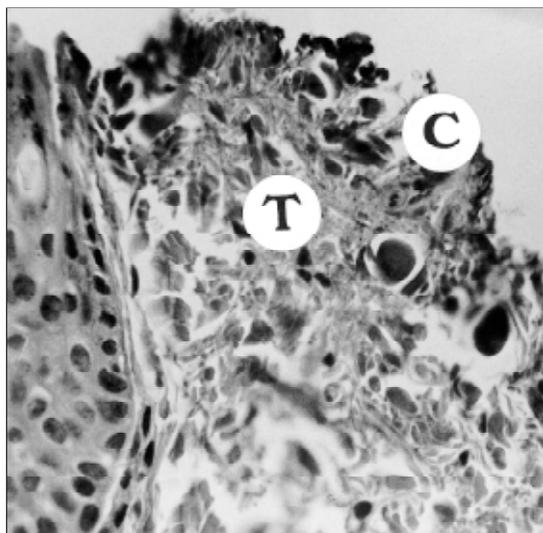


Figura 6 – Pele lesionada pelo *laser erbium*, na qual se observa uma zona de coagulação (C) mais delgada se comparada à do *laser* CO₂. A zona de transição (T) apresenta-se semelhante à provocada pelo *laser* CO₂ (tricolor de Gomori 400x)

Nos cortes corados pela HE, as fibras colágenas perdem a sua afinidade tintorial pela eosina (rósea) para a hematoxilina, corando-se, portanto, em azul. A zona de coagulação apresenta-se bem definida nesta coloração, embora possa se visualizar muito pouco a zona de transição. Na coloração pela orceína, observa-se bem a zona de coagulação, e a zona de transição é mais bem visualizada que pela coloração de HE. As fibras colágenas, coradas habitualmente em amarelo, tornam-se escurecidas e acastanhadas após a utilização do *laser*. Nos cortes corados pela coloração de tricrômico de Gomori, tanto a zona de coagulação como a zona de transição são bem demarcadas. As fibras colágenas, coradas normalmente em verde, alteram-se para vermelho.

Discussão

A utilização do *laser* no tratamento do envelhecimento facial atinge, atualmente, grande popularidade em todo o mundo.

Os efeitos histopatológicos do uso do *laser* de CO₂ na pele são bem conhecidos e documentados. O seu uso crescente em procedimentos dermatológicos cosméticos decorreu de sua grande precisão na ablação da pele, com pouca interferência no processo de recuperação do tecido, em comparação com processos de exfoliação química da pele. Basicamente, a propriedade deste *laser* de emitir séries controladas de pulsos de alta energia e curta duração permite menores tempos de exposição, irradiações maiores, com ablação mais precisa da área-alvo e dano tecidual periférico mínimo, como observado por Cotton *et al.* (4), em 1996.

Nanni *et al.* (9), em 1998, alertaram para o fato de que, apesar do entusiasmo com o uso do *laser* de CO₂ para procedimentos como o rejuvenescimento cutâneo, este não é um procedimento inteiramente isento de riscos. Cicatrizes, mudanças de textura, alterações pigmentares, infecção e muitas outras complicações podem ocorrer com o uso de *laser* pulsado de CO₂, mesmo quando manuseado pelo mais experiente operador de *laser*. Apesar disso, o *laser* de CO₂ é um método seguro e efetivo de rejuvenescimento facial, quando operado por um médico treinado para tal procedimento (11).

O *laser* de CO₂ provoca uma lesão térmica responsável pela remoção de uma camada mais superficial de pele, composta de tecido epidérmico e derme

superficial papilar que sofreram alterações degenerativas. Por outro lado, o *laser* de Erbium:YAG é altamente absorvido pela água, sendo assim absorvido superficialmente na pele com uma propriedade de ablação mais precisa e menor lesão térmica em relação ao *laser* de CO₂. Com isso, a cicatrização é mais rápida e o eritema menos evidente, desaparecendo mais rapidamente.

Yang et al. (14), em 1995, investigaram a ablação do *laser* de CO₂ ultrapulsado em pele de coelhos. A avaliação histológica demonstrou que a epiderme e a arquitetura do colágeno na derme papilar encontravam-se homogeneamente destruídas logo após a ablação. Estes achados coincidiram com os do nosso estudo, apesar de este se utilizar de pele de rato. Encontramos uma epiderme totalmente ablada, juntamente com uma porção da derme papilar. O restante da derme papilar apresentava dano térmico residual, representado pela homogeneização das suas fibras colágenas e elásticas. Ainda com relação ao estudo de Yang, a ablação pelo *laser* ultrapulsado de CO₂ removeu a pele dos coelhos precisamente e sem hemorragia, além de não haver formação de cicatriz. Se se comparar o *laser* de CO₂ de pulsos curtos com o de ondas contínuas, não se observa uma diferença significativa no dano térmico pela análise histológica, ao menos quando esta é realizada logo após a ablação (11).

Weiss et al. (12), em 1999, utilizando *laser* de Erbium:YAG para rejuvenescimento em região periorbital em 50 pacientes com pele de tipos I-III de Fitzpatrick, com acompanhamento de até um ano, demonstraram um substancial efeito terapêutico, obtendo melhora de aproximadamente 75% na maioria dos pacientes, com um mínimo de efeitos colaterais. O *laser* de Erbium:YAG demonstrou ser seguro e eficiente. A avaliação histológica mostrou remoção completa da epiderme com uma a três passadas e, abaixo das áreas de perda epidérmica, houve uma pequena zona de dano térmico na derme papilar, representada por fibras coaguladas, o que coincidiu com a análise histológica do presente estudo.

De acordo com Kaufmann et al. (7), o *laser* de Erbium:YAG tem se mostrado um método ablativo eficaz, com dano térmico mínimo, devido à sua característica peculiar de absorção pela água tecidual, dez vezes maior que a do *laser* de CO₂. A adição de *laser* Erbium:YAG seguindo o rejuvenescimento por *laser* de CO₂ reduz a duração do possível edema, a

formação de crosta e o prurido após a aplicação, em comparação com o uso isolado de *laser* pulsado de CO₂ (8).

De acordo com a análise histológica de Adrian (1), em 1999, o *laser* de Erbium:YAG é capaz de verdadeiras ablações de tecido com um pequeno dano térmico residual, em contraste com o *laser* de CO₂, o qual vaporiza a água tecidual e está associado a significativa coagulação térmica tecidual. Isto pôde ser observado em nosso estudo, no qual o dano de ablação foi maior com o *laser* erbium. Já o DTR foi maior com o *laser* de CO₂, pois a zona de coagulação é mais espessa, uma vez que este *laser* vaporiza a água com grande intensidade. Outra observação importante é que o *laser* de Erbium:YAG é capaz de efeitos ablativos teciduais precisos, o que também está em concordância com a lesão em platô observada em nosso estudo. Já o *laser* de CO₂ provoca lesão menos precisa, em U, com diferentes profundidades de dano de ablação. Alster (2), em 1999, também observou, histologicamente, ablação epidérmica parcial após uma a duas passadas de *laser* Erbium:YAG em pele humana. Três passadas produziram total ablação epidérmica, sem dano residual mensurável na derme. Este estudo confirma as diferenças entre o *laser* de CO₂ e o de Erbium:YAG, principalmente em relação à profundidade de ablação e aos efeitos teciduais. Enquanto os efeitos térmicos do *laser* de CO₂ produzem uma zona relativamente abrangente de necrose coagulativa, afetando a homeostase e a retração do colágeno, o efeito tecidual fotomecânico do *laser* de Erbium:YAG resulta em menores difusão térmica, necrose coagulativa, homeostasia e retração colágena. Além disto, também observou-se no presente estudo que, quanto ao dano de ablação, o *laser* de CO₂ provoca uma lesão heterogênea na profundidade, mas homogênea em sua extensão, pois não se observaram intervalos de pele não-lesada em meio às áreas de aplicação (Figura 1). Comparativamente, o *laser* erbium apresenta um dano de ablação diferente do provocado pelo *laser* de CO₂, sendo heterogêneo em sua extensão e homogêneo na profundidade, ou seja, ocorrem intervalos de pele não-lesada em meio às áreas de aplicação (Figura 3).

O dano térmico residual constitui-se histologicamente de duas zonas: a zona de coagulação, representada pelas fibras colágenas e elásticas completamente homogeneizadas, e a zona de transição, situada mais profundamente, na qual as fibras apre-

sentam-se parcialmente lesadas. Analisando-se o dano térmico residual, o *laser* de CO₂ provoca, em comparação com o *laser erbium*, um maior dano térmico, apresentando tanto a zona de coagulação como a zona de transição espessas. O *laser* de *erbium* provoca um menor dano térmico, com uma zona de coagulação pequena e uma zona de transição semelhante àquela observada no *laser* de CO₂. Rubach *et al.* (10), em 1997, demonstraram remoção completa e uniforme de epiderme, com ablação da derme papilar, quando usou-se o *laser* de CO₂ em 74 pacientes, com graus variáveis de efeitos térmicos, demonstrados pela coagulação de faixas colágenas da derme papilar, revelando um padrão amorfo à coloração por HE, em concordância com o nosso estudo. Utley *et al.* (13), em 1999, realizaram um estudo *in vivo* com análise histológica dos efeitos térmicos sofridos pelas estruturas epidérmicas e dérmicas, acompanhando o tratamento com *laser* de CO₂ e *laser* de Erbium:YAG em dez pacientes, com seguimento de sete dias, e concluíram que as amostras nas quais foi aplicado *laser* de CO₂ seguido por *laser* de Erbium:YAG e as amostras

com aplicação somente de *laser* de Erbium:YAG tiveram, ambas, os menores dano colágeno e necrose térmica. Isto ocorreu, provavelmente, no primeiro caso, pela remoção parcial efetuada pelo *laser* de Erbium:YAG da necrose térmica que é induzida pelo *laser* de CO₂. Outros autores relataram diminuição dos efeitos adversos quando se usa o *laser* de Erbium:YAG após o tratamento com *laser* ultrapulsado de CO₂, contudo sem diferença notável no grau de melhora das rugas (5).

Conclusão

O *laser erbium* apresenta propriedades distintas do *laser* de CO₂, provocando um dano mais uniforme em sua profundidade, sendo, portanto, mais preciso que o *laser* de CO₂. A avaliação do dano térmico residual também demonstra melhores resultados com o uso do *laser erbium*, este apresentando menor dano tecidual adjacente ao local da aplicação, com menor área de necrose coagulativa que o *laser* de CO₂.

Referências

- Adrian, R.M. Pulsed carbon dioxide and Erbium-YAG laser resurfacing: a comparative clinical and histologic study. *J. Cutan. Laser Ther.*, 1: 29-35, 1999.
- Alster, T.S. Clinical and histologic evaluation of six Erbium:YAG lasers for cutaneous resurfacing. *Lasers Surg. Med.*, 24: 87-92, 1999.
- Anderson, R.R. *et al.* Selective photothermolysis: precise microsurgery by selective absorption of pulsed radiation. *Science*, 220: 524-7, 1983.
- Cotton, J. *et al.* Histologic evaluation of preauricular and postauricular human skin after high-energy, short-pulse carbon dioxide laser. *Arch. Dermatol.*, 132: 425-8, 1996.
- Goldman, P.M. *et al.* Combined laser resurfacing with the 950-nsec pulsed CO₂ + Er:YAG lasers. *Dermatol. Surg.*, 25: 160-3, 1999.
- Gordon, J.P. *et al.* The Maser: new type of amplifier, frequency standard and spectrometer. *Physiol. Rev.*, 99: 1264-74, 1955.
- Kaufmann, R. *et al.* Pulsed Erbium:YAG laser ablation in cutaneous surgery. *Lasers Surg. Med.*, 19: 324-30, 1996.
- McDaniel, D.H. *et al.* Combined CO₂/Erbium:YAG laser resurfacing of peri-oral rhytides and side-by-side comparison with carbon dioxide laser alone. *Dermatol. Surg.*, 25: 285-93, 1999.
- Nanni, C.A. *et al.* Complications of cutaneous laser surgery. *Dermatol. Surg.*, 24: 209-19, 1998.
- Rubach, B.W. *et al.* Histological and clinical evaluation of facial resurfacing using a carbon dioxide laser with the computer pattern generator. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 123: 929-34, 1997.
- Speyer, M.T. *et al.* Erythema after cutaneous laser resurfacing using a porcine model. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 124: 1008-13, 1998.
- Weiss, R.A. *et al.* Periorbital skin resurfacing using high energy Erbium:YAG laser: results in 50 patients. *Lasers Surg. Med.*, 24: 81-6, 1999.
- Utley, D.S. *et al.* Histologic analysis of the thermal effect on epidermal and dermal structures following treatment with the superpulsed CO₂ laser and the Erbium:YAG laser: an *in vivo* study. *Lasers Surg. Med.*, 24: 93-102, 1999.
- Yang, C.C. *et al.* Animal study of skin resurfacing using the ultrapulse carbon dioxide laser. *Ann. Plast. Surg.*, 35: 154-8, 1995.

Endereço para correspondência

Lúcia de Noronha
Laboratório de Patologia Experimental
Pontifícia Universidade
Católica do Paraná
Rua Imaculada Conceição 1155
Prado Velho
CEP 80215-030 – Curitiba-PR
Cx. postal 16.210 – CEP 81611-970
Tel.: (41) 330-1597 – Fax: (41) 330-1621
e-mail: luno@uol.com.br