

MATHEUS BENJAMIN BENAGLIA

**ESTUDO MORFOLÓGICO COMPARATIVO DA CRIOTERAPIA COM
NITROGÊNIO LÍQUIDO E GÁS REFRIGERANTE PROPANO-BUTANO
NA MUCOSA BUCAL DE RATOS**

CAMPO GRANDE
2014

MATHEUS BENJAMIN BENAGLIA

**ESTUDO MORFOLÓGICO COMPARATIVO DA CRIOTERAPIA COM
NITROGÊNIO LÍQUIDO E GÁS REFRIGERANTE PROPANO-BUTANO
NA MUCOSA BUCAL DE RATOS**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Odontologia da Universidade Federal
de Mato Grosso do Sul, para obtenção
do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. José Carlos
Garcia de Mendonça

CAMPO GRANDE
2014

Catálogo - na - Publicação
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Benaglia, Matheus Benjamin

Estudo morfológico comparativo da crioterapia com nitrogênio líquido e gás refrigerante propano-butano na mucosa bucal de ratos / Matheus Benjamin Benaglia. -- Campo Grande, MS, 2014.

132 p. : il. 30 ; 29 cm

Orientador: José Carlos Garcia de Mendonça.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

1. Crioterapia 2. Nitrogênio líquido 3. Gás refrigerante 4. Mucosa bucal

FOLHA DE APROVAÇÃO

MATHEUS BENJAMIN BENAGLIA

**ESTUDO MORFOLÓGICO COMPARATIVO DA CRIOTERAPIA COM
NITROGÊNIO LÍQUIDO E GÁS REFRIGERANTE PROPANO-BUTANO NA
MUCOSA BUCAL DE RATOS**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Odontologia da Universidade Federal
de Mato Grosso do Sul, para obtenção
do título de Mestre.

Resultado_____

Campo Grande (MS), _____ de _____ de 2014.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Carlos Garcia de Mendonça
Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Prof. Dr. José Peixoto Ferrão Júnior
Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Prof^a. Dr^a Ellen Cristina Gaetti Jardim
Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu pai Luís Antônio Benaglia “in memoriam” pela grande lição de vida deixada e por tudo que me ensinou no curto período de sua vida. Seu exemplo e os seus princípios ainda permanecem vivos e guiam-me até hoje.

À minha mãe Lenira de Q. B. Benaglia por tudo que representa em minha vida e pelo amor e carinho incondicionais. Ela é um exemplo de fidelidade, força e superação.

Ao meu irmão, amigo e eterno companheiro Bruno B. Benaglia e sua bela família, Maria Alice S. C. Benaglia, minha cunhada, e minhas lindas sobrinhas Maria Eduarda C. Benaglia e Maria Luiza C. Benaglia, por todos os momentos de alegria que já passamos juntos e por tudo que vocês representam na minha vida.

À minha esposa Bruna dos S. S. Benaglia por todo amor, carinho, apoio, dedicação e compreensão. Sou muito grato a Deus por ter uma pessoa tão especial em minha vida e por ter a oportunidade de ter um amor eterno. É difícil resumir em poucas palavras o que sinto por ela. Só sei que quantas vidas eu tivesse, tantas viveria, só para estar ao seu lado.

A toda família da minha esposa, que me recebeu com tanto amor e carinho, e que é muito bem representada na pessoa da Dona Ivete Ferreira dos Santos “in memoriam”, minha avó de coração, uma pessoa de qualidades infinitas e de um coração tão puro como o de uma criança, que infelizmente nos deixou este ano.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, que se fez presente em todos os momentos da minha vida. Agradeço a Ele todos os dias por ter uma ótima família e por todas as bênçãos que já recebi.

À Faculdade de Odontologia Prof. Albino Coimbra Filho da UFMS pelo ensino de qualidade na graduação e que hoje faz a diferença na minha vida profissional.

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da FAODO/ UFMS, que através de seus excelentes professores e funcionários possibilitaram a realização de mais este sonho, que é obter o título de mestre em odontologia.

Ao Biotério Central da UFMS, na pessoa da Prof^a Dra. Maria Araújo Teixeira e funcionários, que prontamente me atenderam e viabilizaram a execução desta pesquisa.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Carlos Garcia de Mendonça pelas orientações e ensinamentos que foram fundamentais na elaboração deste trabalho. Além disso, devo a este excelente profissional grande parte da minha formação na área da cirurgia.

Ao Prof. Dr. Pedro Gregol da Silva, coordenador do Programa de Pós-graduação em Odontologia da FAODO/UFMS, que através de sua dedicação e esforço trouxe o curso de pós-graduação *stricto sensu* para nossa faculdade.

À Prof^a Dra. Márcia Rodrigues Gorisch pela leitura das lâminas desta pesquisa. Agradeço toda a sua dedicação e auxílio no desenvolvimento deste trabalho.

À Dra. Ellen C. Gaetti Jardim pela enorme contribuição em todas as etapas desta pesquisa, da fase experimental até o texto final.

Ao Prof. Dr. José Peixoto Ferrão Júnior, meu orientador na graduação em Odontologia e professor no Programa de Pós-graduação em Odontologia da FAODO/UFMS, pela participação direta na minha formação e pela grande colaboração nesta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Paulo Zárate, pelos ensinamentos, incentivos e amizade durante a graduação e pós-graduação. Sua grande dedicação ao ensino é um exemplo para todos nós.

Ao meu irmão, Dr. Bruno Benjamin Benaglia, Médico Veterinário e excelente profissional, pela dedicação e empenho na execução da etapa experimental desta pesquisa.

À minha esposa Bruna dos S. S. Benaglia pela ajuda na fase experimental e adequação dos textos deste trabalho e, principalmente, pelo apoio durante todas as etapas desta pesquisa.

A todos que contribuíram de alguma forma, direta ou indiretamente, com este trabalho.

O que é sucesso?

*“Rir muito e com frequência; ganhar o respeito de pessoas inteligentes e o afeto das crianças; merecer a consideração de críticos honestos e suportar a traição de falsos amigos; apreciar a beleza e encontrar o melhor nos outros; deixar o mundo um pouco melhor, seja por uma saudável criança, um canteiro de jardim ou uma remida condição social; saber que ao menos uma vida respirou melhor porque você viveu.
Isto é ter sucesso!”*

(Ralph Waldo Emerson)

RESUMO

Benaglia MB. Estudo morfológico comparativo da crioterapia com nitrogênio líquido e gás refrigerante propano-butano na mucosa bucal de ratos. Campo Grande; 2014. [Dissertação – Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

Crioterapia ou criocirurgia é uma modalidade terapêutica ou técnica cirúrgica que consiste na aplicação de substâncias criogênicas em temperaturas extremamente baixas com a finalidade de se conseguir a destruição tecidual. Esta substância provoca uma destruição controlada e não seletiva, sendo utilizada no tratamento de diversas lesões da região orofacial. A técnica de crioterapia pode ser realizada através do sistema fechado, no qual não há contato direto dos criógenos com os tecidos, utilizando-se de sondas para sua aplicação, e também através do sistema aberto, no qual há contato direto do agente criogênico com os tecidos, utilizando-se hastes de algodão ou *sprays*. A criocirurgia apresenta diversas vantagens, tais como ausência de sangramento, baixo risco de infecção, mínimo desconforto e baixo custo. Além disso, é uma técnica simples, eficaz e conservadora. Atualmente, o nitrogênio líquido é o padrão-ouro na crioterapia, porém outras opções mais viáveis de criógenos são necessárias. Pensando nisso, o presente trabalho teve como objetivo estudar e comparar os efeitos clínicos e histológicos da crioterapia com nitrogênio líquido e gás refrigerante propano-butano na mucosa bucal de ratos. Foram utilizados 30 ratos machos da linhagem Wistar, adultos jovens, clinicamente sadios, com peso médio de 400 g, provenientes do Biotério Central da UFMS. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em cinco grupos, com 6 animais cada, de acordo com o período estipulado para eutanásia de 1, 3, 7, 14 e 21 dias. Cada grupo foi subdividido em grupo-teste, utilizando o gás refrigerante propano-butano (Endo-Frost®) na mucosa interna do lábio superior direito de cada animal; e grupo-controle, utilizando o nitrogênio líquido no lado contralateral. Foi realizado dois ciclos de 10 segundos, com intervalo de 2,5 minutos com cada material testado. Após o período experimental os animais foram sacrificados e lâminas histológicas representativas de cada espécie foram obtidas. O Endo-Frost® e o nitrogênio líquido apresentaram resultados estatisticamente iguais ou equivalentes para todos os critérios macroscópicos e histológicos. Concluiu-se que os dois protocolos utilizados foram capazes de produzir crionecrose, porém com menor morbidade no grupo-teste, no qual o edema foi menor e cicatrização completa mais precoce.

Palavras-chave: crioterapia, nitrogênio líquido, gás refrigerante, mucosa bucal

ABSTRACT

Benaglia MB. Comparative morphological study of cryotherapy with liquid nitrogen and refrigerant gas propane-butane in the buccal mucosa of rats. Campo Grande, 2014. [Dissertation – Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

Cryotherapy or cryosurgery is a therapeutic modality or surgical technique that consists in the application of cryogenic substances at extremely low temperatures with the purpose of reaching the tissue destruction. This substance causes a controlled destruction and non-selective, being used in the treatment of various lesions of the orofacial region. The technique of cryotherapy can be performed through the closed system, in which there is no direct contact of criógenos with tissues, using probes for their application, and also through the open system, in which there is direct contact with cryogenic agent with the tissue, using cotton swabs or sprays. The cryosurgery has several advantages, such as the absence of bleeding, low risk of infection, minimum discomfort and low cost. In addition, it is a simple technique, effective and conservative. Currently, the liquid nitrogen is the gold-standard for cryotherapy, however other options more viable criógenos are necessary. With this in mind, the objective of the present study was to evaluate and compare the clinical effects and histological of cryotherapy with liquid nitrogen and refrigerant gas propane and butane in the buccal mucosa of rats. Were used 30 male Wistar rats, young adults, clinically healthy, with average weight of 400 g, were obtained from the Central Animal Laboratory of the UFMS. The animals were randomly divided into five groups, with 6 animals each, in accordance with the stipulated period for euthanasia of 1, 3, 7, 14 and 21 days. Each group was subdivided into group-test, using the refrigerant gas propane-butane (Endo-Frost®) in the mucosa inside the upper lip right of each animal; and the control group, using the liquid nitrogen on the contralateral side. Two cycles of 10 seconds was performed with an interval of 2.5 minutes with each tested material. After the experimental period the animals were sacrificed and representative histological slides of each species were obtained. The Endo-Frost® and the liquid nitrogen presented results statistically equal or equivalent for all criteria macroscopic and histological. It was concluded that the two protocols used were capable of producing cryonecrosis, however with lower morbidity in test-group, in which the edema was less and complete healing more early.

Key words: cryotherapy, liquid nitrogen, refrigerant gas, buccal mucosa

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Número de casos de cada parâmetro avaliado no aspecto morfológico. Campo Grande, MS, 2014	88
Tabela 2 – Número de casos de cada parâmetro avaliado na resposta inflamatória. Campo Grande, MS, 2014.....	89

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Local onde os animais ficaram durante a pesquisa.....	64
Figura 2 – Fluxograma da amostra.....	65
Figura 3 – Dispositivo protetor com abertura de 5 mm de diâmetro e 2 mm de espessura.....	66
Figura 4 – Desenho esquemático das medidas do dispositivo protetor e sua adaptação nos tecidos (B) para formação da bola de gelo (A)	67
Figura 5 – Técnica de anestesia intraperitoneal	69
Figura 6 – Demarcação com caneta preta dos locais de aplicação do Endo-Frost® (A) e do nitrogênio líquido (B). O ponto de referência da comissura labial (C)	70
Figura 7 – Local de aplicação da crioterapia com 5 mm de diâmetro (seta menor). Limite lateral (A) e limite anterior (B)	70
Figura 8 – Demonstração do posicionamento correto do Nitrospray® e a utilização do dispositivo protetor. Notar o posicionamento do animal na mesa cirúrgica	71
Figura 9 – Demonstração do posicionamento correto do Endo-Frost®.	71
Figura 10 – Desenho esquemático demonstrando a técnica de congelamento com o Endo-Frost® (A) e com <i>spray</i> de nitrogênio, com formação da bola de gelo no interior dos tecidos	72
Figura 11 – Aspecto clínico da bola de gelo formada após o primeiro ciclo de congelamento de 10 segundos (A). Aspecto da mucosa após 2,5 minutos de reaquecimento espontâneo (B)	73
Figura 12 – Condições das acomodações e identificação dos animais por crachás	73
Figura 13 – Biópsia da criolesão (A) e armazenamento das peças em formol a 10%	74
Figura 14 – Câmara de CO ₂	75
Figura 15 – Quadro demonstrativo dos critérios utilizados para análise macroscópica com relação à morfologia. Escore 0, evento ausente, e escore 1, evento presente.	78
Figura 16 – Quadro demonstrativo dos critérios utilizados para análise microscópica com relação à morfologia. Escore 0, evento ausente, e escore 1, evento presente..	79
Figura 17 – Quadro demonstrativo dos critérios e escores utilizados para análise microscópica com relação à resposta inflamatória.....	80
Figura 18 – Aspecto clínico da criolesão no 1º dia de pós-operatório. Notar o edema mais pronunciado no lado esquerdo, grupo este tratado com nitrogênio líquido.....	82
Figura 19 – Avaliações clínicas. Aspecto das lesões da mucosa bucal nos 5 períodos pós-operatórios. Notar a evolução da cicatrização da criolesão. D = Endo-Frost, E = Nitrogênio líquido	84
Figura 20 – Gráfico da análise macroscópica das feridas	85
Figura 21 – Gráfico da análise microscópica das feridas	87
Figura 22 – Grupo do Endo-Frost® (1 dia). Epitélio com início de bolha (seta) e necrose (N). Lâmina própria com edema e infiltrado inflamatório agudo e intenso (*). Aumento de 100x.	90
Figura 23 – Grupo do N ₂ (1 dia). Epitélio com bolha (B), úlcera (U) e necrose (seta). Lâmina própria com edema. Aumento de 100x.....	90

Figura 24 – Grupo do Endo-Frost® (3 dias). Notar a formação de um abscesso subepitelial (A) com infiltração neutrofílica na lâmina própria. Aumento de 40x	91
Figura 25 – Grupo do Endo-Frost® (7 dias). Vista panorâmica da úlcera no tecido epitelial (seta). Aumento de 40x.....	91
Figura 26 – Grupo do Endo-Frost® (7 dias). Úlcera com necrose superficial (U); formação de microbolhas subepiteliais (seta); e edema generalizado no conjuntivo (*). Aumento de 100x.	92
Figura 27 – Grupo do Endo-Frost® (7 dias). A - Detalhe das bolhas subepiteliais (*). B – Vasos sanguíneos congestionados (seta), infiltrado inflamatório crônico e edema tecidual. Aumento de 400x.....	92
Figura 28 – Grupo do N ₂ (7 dias). Vista panorâmica da bolha com exsudação sero-hemorrágica com infiltrado inflamatório moderado. Aumento de 40x.....	93
Figura 29 – Grupo do N ₂ (7 dias). A) Notar a bolha intraepitelial com exsudação hemorrágica. B) Necrose do tecido conjuntivo com focos hemorrágicos e infiltrado inflamatório crônico. Aumento de 400x.	93
Figura 30 – Grupos teste e controle com 21 dias. A) Epitélio com estratificação em ordenação; lâmina própria com menos vasos sanguíneos, bem estruturada e com células inflamatórias crônicas e de intensidade leve. B) Epitélio proliferativo com figuras de mitose e estratificação próximo do normal; lâmina própria com edema, grande quantidade de vasos sanguíneos e infiltrado inflamatório leve. Aumento de 400x	94

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
UFMS	Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CEUA-UFMS	Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMS
HPV	Papilomavírus Humano
Fig.	Figura
HE	hematoxilina e eosina
pH	Potencial hidrogeniônico
a. C	antes de Cristo
µm	micrômetros
mm	milímetros
cm	centímetros
cm ²	centímetros quadrados
mg	miligrama
s	segundos
min	minutos
g	gramas
Kg	quilogramas
ml	mililitro
L	litro
N ₂	nitrogênio líquido
NO ₂	óxido nitroso

CO ₂	dióxido de carbono
°C	grau Celsius
°C/s	grau Celsius por segundo
N ₂	nitrogênio líquido

LISTA DE SÍMBOLOS

® marca registrada

% por cento

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 Conceitos	18
2.2 Histórico	18
2.3 Agentes criogênicos	21
2.4 Aparelhagem	22
2.5 Mecanismos de destruição celular	22
2.6 Técnicas utilizadas	31
2.7 Alterações histológicas	54
2.8 Vantagens	57
2.9 Desvantagens	60
3 OBJETIVOS	62
4 METODOLOGIA	63
4.1 Desenho do estudo	63
4.2 Animais experimentais	63
4.3 Amostra	64
4.4 Materiais	65
4.4.1 Aparelhagem	65
4.4.2 Dispositivo protetor	66
4.4.3 Agentes criogênicos	67
4.5 Técnica operatória	68
4.6 Biópsia e processamento das peças	74
4.7 Avaliação macroscópica	75
4.8 Avaliação microscópica	76
4.9 Análise dos resultados	77

5 RESULTADOS	81
5.1 Exame clínicos dos animais	81
5.2 Análise macroscópica	83
5.3 Análise microscópica	86
6 DISCUSSÃO	95
7 CONCLUSÕES	108
REFERÊNCIAS	109
APÊNDICES	119
ANEXO	132

1 INTRODUÇÃO

Crioterapia é a aplicação de baixa temperatura capaz de modificar o meio celular. Esta foi primeiramente utilizada nos tecidos com objetivos anestésicos, para coibir hemorragias e no controle de edemas pós-traumas (SANTOS; SANT'ANA-FILHO, 2002).

Uma das modalidades da crioterapia é a criocirurgia, na qual se utiliza temperaturas extremamente baixas para provocar uma isquemia regional, levando a um dano tecidual e, conseqüentemente, à morte celular (BELTRÃO, 2003).

O uso de baixas temperaturas como opção terapêutica data da antiguidade, com impressões em papiro realizadas por Edwin Smith em 3.500 a.C. (LEOPARD, 1975). Desde então, relata-se o uso do frio como forma de tratamento.

Segundo Gage (1998), o uso do nitrogênio líquido teve seus primórdios a partir de 1950, no período Pós-Segunda Guerra Mundial, superando os já consagrados ar e oxigênio liquefeitos, em virtude do potencial explosivo deste último.

A crioterapia local moderna teve início em 1959, com o neurocirurgião norte-americano Dr. Irving Cooper que utilizou esta técnica para tratar a doença de Parkinson. Ele projetou e construiu um aparelho que possibilitava o uso nitrogênio líquido em baixas temperaturas e com maior controle. Devido ao êxito obtido, o pesquisador resolveu estudar os efeitos do congelamento na periferia de lesões superficiais, observando que a zona congelada sofria necrose e desaparecimento das células neoplásicas. Este processo ficou conhecido como crionecrose (BARNARD, 1980; BANSAL et al., 2012).

Na década de 60, surgiram os primeiros relatos sobre a utilização desta técnica na odontologia. Durante as décadas de 70 e 80, a criocirurgia foi aprimorada e difundiu-se entre os cirurgiões-dentistas.

A criocirurgia é um método efetivo de destruição tecidual por congelamento, pois leva à destruição controlada e não seletiva (EMMINGS et al., 1967; LEOPARD, 1975).

Existem duas formas para a realização da crioterapia local: através do sistema fechado e pelo sistema aberto. No sistema fechado não há contato do criógeno com

os tecidos, diferentemente do sistema aberto que a crionecrose se dá por contato (LEOPARD, 1975; YEH, 2000).

Várias substâncias podem ser usadas como agentes criogênicos. Os mais comuns são o dióxido de carbono (-79C°), o óxido nitroso (-90C°), líquido de fluorcarbono (-60C°), gás refrigerante tetrafluoretano (-47C°) e o nitrogênio líquido (-196C°), destacando-se o papel deste último que é considerado o gás ideal para criocirurgia (THAI; SINCLAIR, 1999; KUMAR et al., 2013).

A criocirurgia apresenta diversas vantagens, tais como ausência de sangramento, baixa incidência de infecção, dor e desconforto mínimo, cicatrização favorável e, além disso, é uma técnica de baixo custo, simples e conservadora (POGREL, 1993; SANTOS; SANT'ANA-FILHO, 2002).

Diversas patologias orofaciais já foram tratadas pela técnica da crioterapia. Dentre estas, destacam-se as leucoplasias, hiperplasias, granulomas, mucocelos, rânulas, hemangiomas, fibromas, líquen plano, queilite actínica, verruga vulgar, papilomas, estomatite nicotínica, ceroacantomas, lesões por HPV, doenças periodontais, ameloblastomas e ceratocistos. (EMMINGS et al., 1967; LEOPARD, 1975; POGREL, 1993; THAI; SINCLAIR, 1999; COSTA et al., 2010; MENDONÇA et al., 2011; BANSAL et al., 2012).

Até o momento, o nitrogênio líquido é considerado o principal agente crioterápico no tratamento das lesões da cavidade bucal. Entretanto, este criógeno apresenta algumas desvantagens, tais como os custos dos equipamentos (criocautério, contêiner próprio para armazenamento, ponteiros e acessórios) e a alta taxa de evaporação quando em uso ou quando armazenado por longos períodos.

É inegável o desejo de se empregar técnicas e recursos terapêuticos mais conservadores e menos onerosos no tratamento das lesões orofaciais. Desta forma, surgiu-se a ideia de procurar um criógeno alternativo ao nitrogênio líquido, que agregasse as vantagens deste, e ainda fosse de fácil acesso ao cirurgião-dentista. Pensando nisso, propôs-se testar o gás refrigerante propano-butano (Endo-Frost®), utilizado na odontologia para testes de vitalidade pulpar, como agente crioterápico.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Conceito

O prefixo “crio”, do grego *kryos*, significa frio e o radical “terapia”, do grego *therapéia*, significa "tratamento". Assim, a crioterapia consiste na utilização do frio como medida terapêutica. A criobiologia estuda os efeitos produzidos nos tecidos e nas células quando submetidos a temperaturas abaixo de zero grau Celsius (TURJANSKY; STOLAR, 1992).

A crioterapia descreve em sentido amplo, o uso frio como modalidade terapêutica, sendo a criocirurgia, ou também denominada de crioablação, uma forma de crioterapia, que se utiliza de baixas temperaturas para provocar uma destruição celular em um tecido vivo de forma localizada, ou seja, *in situ* (TURJANSKY; STOLAR, 1992; GAGE, 1998).

Denomina-se criolesão o efeito localizado do congelamento no tecido (BARNARD, 1980). A lesão criogênica é caracterizada por uma necrose circunscrita que corresponde ao volume de tecido previamente congelado (GAGE; BAUST, 1998). Os criógenos, agentes criogênicos ou agentes crioterápicos são substâncias ou gases capazes de atingir baixas temperaturas, sendo utilizados com finalidades terapêuticas, para a destruição de tecidos, ou como agentes congelantes, para conservação de substâncias biológicas ou alimentares (TURJANSKY; STOLAR, 1992).

2.2 Histórico

O uso do frio na área da saúde vem de longa data. De acordo com o relato no papiro de Edwin Smith 3.500 a. C., que traduziu para o inglês por Breasted, em 1930, a aplicação de baixas temperaturas já era utilizada pelos egípcios com objetivo de produzir anestesia (LEOPARD, 1975).

São encontrados relatos semelhantes, tanto na *Ilíada* de Homero - século IX a.C -, quanto em citações de Hipócrates - século V a.C -, que descreviam sua utilização em redução de edema pós-trauma e estancamento de hemorragias (WHITTAKER, 1986).

O Dr. James Arnott foi o primeiro a relatar o uso de baixas temperaturas como opção terapêutica para lesões malignas, usando uma mistura de gelo e sal, visando à necrose tecidual de um neoplasma de mama (LEOPARD, 1975; WHITTAKER, 1986; GAGE, 1998).

Em 1870, durante a guerra franco-prussiana, os médicos do General Napoleão Bonaparte recomendavam o congelamento, com neve, de membros de soldados que seriam submetidos a amputações, visando à anestesia e à hemostasia (LEOPARD, 1975).

Também no século XIX, cientistas observaram que gases atmosféricos, quando comprimidos, aqueciam e se tornavam líquidos. Quando estes fluidos eram liberados, expandiam-se e resfriavam-se. Usando este princípio, o oxigênio foi o primeiro ar a ser liquefeito, e, posteriormente, todos os gases “permanentes”, como o oxigênio, o nitrogênio e o hidrogênio, puderam ser liquefeitos (GAGE, 1998).

A primeira aplicação clínica de gases liquefeitos para uso médico foi relatada por A. Campbell White em 1889, Nova York. Este pesquisador utilizou o gás refrigerado no tratamento de diversas doenças de pele, que incluíam herpes zoster, cancro mole, nevos, lúpus eritematoso sistêmico, úlceras varicosas de pernas e epitelomas. Logo em seguida, em 1892, James Dewar desenvolveu um recipiente a vácuo, no qual os gases liquefeitos podiam ser armazenados, estabelecendo, assim, o comércio dos gases e o termo agente criogênico passou a ser utilizado (GAGE, 1998).

O melhoramento das técnicas de congelamento só foi possível em 1907, quando William Pusey popularizou o uso do dióxido de carbono - CO₂ - (gelo seco) como agente criogênico no tratamento de hemangiomas de queloides. Afirmando então que este produto poderia atingir temperaturas mais baixas (GRIMMETT, 1961; LEOPARD, 1975; GAGE, 1998).

Com o avanço tecnológico em equipamentos e a maior disponibilidade de gases liquefeitos, o método de congelamento das lesões, inicialmente utilizado por dermatologistas, tornou-se possível em diversos ramos da cirurgia (LEOPARD; POSWILLO, 1974). Em 1920, o oxigênio passou a ser o gás mais utilizado, porém,

por ser altamente inflamável, o dióxido de carbono o substituiu amplamente, seguido pelo hidrocarbono fluorado, conhecido como gás freon (LEOPARD; POSWILLO, 1974; GAGE, 1998).

Após a segunda Guerra Mundial, o nitrogênio líquido tornou-se comercialmente disponível, e por ser mais seguro e atingir temperaturas mais baixas como -196°C , este gás, gradualmente, ganhou a preferência nos tratamentos cirúrgicos (GAGE, 1998).

O desenvolvimento da criocirurgia como técnica terapêutica recebeu maior estímulo após o aparecimento de uma aparelhagem própria, que permitia o congelamento *in situ* com o nitrogênio líquido de forma mais prática, utilizando pontas de aplicação e comandos de controle para regulação da temperatura desejada. Assim, além dos dermatologistas, esta técnica passou a ser apreciada pelos neurocirurgiões, ginecologistas, ortopedistas, urologistas, oftalmologistas, cardiologistas e oncologistas (GAGE, 1998; ZIMMERMAN, CRAWFORD, 2012).

A criocirurgia foi a primeira técnica pouco invasiva utilizada para o tratamento de tecidos neoplásicos, fato este que propiciou seu grande desenvolvimento na década de 60 (GAGE, 1998).

Em 1961, o nitrogênio líquido passou a ser considerado, pelos dermatologistas, muito útil no tratamento de leucoplasias, líquens, granulomas, cicatrizes hipertólicas, acnes e, principalmente, no tratamento da verruga vulgar, sendo utilizado em grandes centros médicos (GRIMMETT, 1961).

Em Odontologia, encontram-se relatos do uso da criocirurgia desde a década de 1960, sendo ela utilizada para tratamento de lesões intraósseas e lesões de mucosa oral (EMMINGS et al., 1967). Esta terapêutica foi bem difundida nas décadas de 70 e 80 (EMMINGS et al., 1967; GAGE, 1998).

Entretanto, a própria natureza pouco invasiva da criocirurgia criou obstáculos para o preciso controle deste procedimento, principalmente em lesões de grandes dimensões ou em órgãos internos. Nestas condições, a falta de precisão foi decisiva para o decréscimo da utilização da técnica na década de 80, restringindo o seu emprego a lesões menores e não associado aos órgãos internos (HOFFMANN; BISCHOF, 2002).

Já na década de 90, o avanço de modelos matemáticos e o desenvolvimento de técnicas de imagem, como a ultrassonografia, tomografias computadorizadas e

ressonância magnética, propiciaram o “renascimento” e novas indicações para aplicação do frio em medicina (HOFFMANN; BISCHOF, 2002).

2.3 Agentes criogênicos

Os agentes criogênicos ou criógenos são gases que podem ser convertidos ao estado líquido e têm a capacidade de extrair calor de tecidos vivos. Diferentes gases atingem distintas temperaturas e pontos de ebulição. Essas características ditam sua adequação ao uso na criocirurgia, pois o tecido alvo deve chegar rapidamente a no mínimo -20°C (LEOPARD, 1975; TAL, 1982; GAGE et al., 2009).

Os criógenos podem ser utilizados com fins médicos para conservação ou destruição de tecidos, ou ainda, como agentes congelantes para preservar substâncias biológicas ou alimentos (GAGE et al., 2009).

O criógeno mais empregado na medicina é o nitrogênio líquido, cuja temperatura potencial é de -196°C , sendo considerado o gás ideal para criocirurgia devido às suas propriedades físicas. Este criógeno é inodoro, atóxico, não inflamável, de fácil transporte e como se trata de um elemento que se encontra em maior proporção no ar atmosférico, é de fácil obtenção, atinge baixas temperaturas e, sobretudo, é um dos mais econômicos (TURJANSKY; STOLAR, 1992; GAGE, 1998; THAI; SINCLAIR, 1999).

Entretanto, várias substâncias podem ser usadas como agentes criogênicos, como o dióxido de carbono, também conhecido como gelo seco ou neve de dióxido de carbono, que atinge -79°C ; o óxido nitroso, que atinge -90°C ; e o líquido de fluorcarbono, que atinge -60°C (THAI; SINCLAIR, 1999).

A maioria das pesquisas, até o momento, utilizou o nitrogênio líquido como principal agente crioterápico no tratamento das lesões da cavidade oral, sendo considerado o padrão-ouro nesta modalidade de tratamento (PRASAD et al., 2009; BANSAL et al., 2012; VYASARAYANI et al., 2014). O custo do nitrogênio líquido é relativamente baixo, porém o custo da aparelhagem (contêiner próprio, criocautério com válvula, ponteiros abertas e fechadas, entre outros) para criocirurgia ainda é considerado elevado para o padrão de muitos consultórios e hospitais (BANSAL et al., 2012). Além disso, este criógeno tem uma vida útil curta devido à sua evaporação

rápida e contínua, mesmo quando armazenado em recipientes fechados, dificultando seu armazenamento por longos períodos (KUMAR et al., 2012).

O gás refrigerante tetrafluoretano atinge a temperatura -47°C , apresenta ponto de fusão de -101°C e ponto de ebulição -20°C (MOURA-NETTO et al., 2007; SINGH et al., 2012). No Brasil é comercializado pela DremaFreeze[®]. Este gás é incolor, não produz resíduo e apresenta segurança clínica comprovada, sendo utilizado na dermatologia e na veterinária, para tratamento de lesões benignas de pele, e na odontologia apenas para realização dos testes de vitalidade pulpar (MOURA-NETTO et al., 2007; SINGH et al., 2012).

Atualmente, os gases refrigerantes começaram a ser utilizados no tratamento criocirúrgico das pigmentações melânicas da gengiva (KUMAR et al., 2012; SINGH et al., 2012; KUMAR et al., 2013;) e como parte do tratamento de tumores benignos da cavidade oral (MENDONÇA et al., 2011).

O gás refrigerante propano-butano (Endo-Frost[®], Roeko, Langenau, Alemanha) é amplamente utilizado na odontologia para se realizar os testes de vitalidade pulpar. Este gás é inodoro, atóxico, inflamável quando exposto ao calor, não produz CFC e atinge a temperatura de -50°C , sendo geralmente aplicado na coroa dentária para o teste de resposta ao frio da polpa dentária (MOURA-NETTO et al., 2007). Entretanto, não existem pesquisas publicadas, até o momento, utilizando este gás refrigerante na mucosa oral ou em qualquer lesão de pele ou mucosa para provocar criolesão.

2.4 Aparelhagem

O desenvolvimento da criocirurgia como recurso terapêutico recebeu maior estímulo após o advento de uma aparelhagem apropriada, que permitia o congelamento *in situ*, com o uso do nitrogênio líquido de maneira mais prática, empregando pontas de aplicação e comandos de controle para regulação da temperatura desejada (GAGE, 1998).

Segundo Bansal et al. (2012), os sistemas disponíveis para uso da criocirurgia podem ser classificados em abertos ou fechados. Os sistemas abertos caracterizam-se pela aplicação direta do agente crioterápico na lesão com hastes de algodão ou por *spray*. As hastes de algodão podem ser confeccionadas de acordo com o tamanho

da lesão. E as ponteiros para o *spray* apresentam orifícios centrais com diversos diâmetros. O sistema aberto está indicado principalmente em lesões proliferativas espessas e invasivas, cujo controle da profundidade de destruição é de importância secundária, bem como no tratamento de lesões ósseas (LEOPARD, 1975; BANSAL et al., 2012).

O sistema fechado, com a utilização de sondas ou probes, oferece um maior grau de controle, sendo a profundidade do congelamento menos profunda do que com o sistema aberto (LEOPARD, 1975; BANSAL et al., 2012).

Segundo Leopard (1975), o sistema fechado pode produzir congelamento através de três tipos diferentes de fenômenos físicos. Estes fenômenos são: a evaporação, mudança de um sólido ou líquido para um gás provocando a queda da temperatura; o efeito Peltier ou efeito termoelétrico, no qual as baixas temperaturas são obtidas pela passagem de uma corrente elétrica que atravessa junções metálicas diferentes; e o efeito Joule-Thomson ou expansão gasosa adiabática, pelo escape de um gás mantido em alta pressão que produz a queda de temperatura.

Com o crescimento da criocirurgia como terapêutica, houve um grande desenvolvimento da aparelhagem para a sua aplicação. Assim, na década de 80, sistemas portáteis e não muito caros foram desenvolvidos (GAGE, 1998).

Borges (2005) relatou a utilização do Cry-Ac 3[®] da Brymill, frisando ser um aparelho versátil, pequeno e de custo relativamente baixo, dispondo de diversas pontas aplicadoras e com diferentes angulações.

Outro aparelho semelhante de criocautério utilizado por dermatologistas, ginecologistas, veterinários e odontólogos é o Nitrospray[®], que também apresenta pontas variadas. Entretanto, atualmente, o único criocautério de nitrogênio líquido que possui registro na ANVISA é o Nitrospray[®].

2.5 Mecanismos de destruição celular

A crionecrose é a lesão celular direta, que ocorre em resposta à exposição à temperatura negativa extrema (BARBOSA; SANVITTO, 1973; COSTA et al., 2010; BANSAL et al., 2012).

A natureza da resposta dos tecidos à crioterapia depende da gravidade da lesão causada pelo frio. Um congelamento lento e de menor intensidade pode provocar apenas uma resposta inflamatória, mas o congelamento rápido e intenso mata as células e resulta em destruição dos tecidos (GAGE, 1998; GAGE et al., 2009). Entretanto, experiências *in vivo* demonstraram que a taxa de resfriamento, se lenta ou rápida, não seria tão importante quanto os outros fatores envolvidos no ciclo congelamento/descongelamento (GAGE et al., 2009).

A aplicação dos agentes crioterápicos em tecidos vivos provoca a formação de cristais intra e extracelulares pelo congelamento dos líquidos, e consequente, alterações teciduais (EMMINGS et al., 1967; LEOPARD; POSWILLO, 1974; HAUSAMEN, 1975; LEOPARD, 1975; POSWILLO, 1978; GAGE et al., 2009; MACCINI et al., 2011; BANSAL et al., 2012). Os efeitos deletérios do congelamento podem ser divididos em diretos e indiretos. Os diretos incluem a desidratação e distúrbio eletrolítico da célula, alteração do pH, inibição enzimática, desnaturação de proteínas e ruptura da membrana celular. Os indiretos referem-se aos efeitos vasculares e imunológicos (LEOPARD, 1975; GONGLOFF; GAGE, 1983; GAGE et al., 2009; BANSAL et al., 2012).

Efeitos diretos do congelamento segundo Leopard (1975) são: o rompimento celular, quando a taxa de congelamento é rápida (maior que 5°C/s) e acontece próximo à sonda, onde a taxa de congelamento atinge -70°C/s, formando cristais intra e extracelulares; a desidratação celular e distúrbios eletrolíticos, que ocorre nas áreas da bola de gelo, onde a temperatura é de -10°C e a taxa de congelamento é de -0,5°C/s, formando somente cristais de gelo extracelulares e, com isso, os distúrbios eletrolíticos (pela diferença de concentração osmótica do líquido intra e extracelular); a zona de escape, que é a área intermediária entre o congelamento rápido e o lento, sendo que nesta região a taxa de sobrevivência celular é relativamente grande se não houver uma nova exposição ao frio; a inibição enzimática, pois o frio altera o metabolismo celular, deixando a célula mais vulnerável aos distúrbios metabólicos; a modificação das proteínas, quando os complexos lipoprotéicos das células e das mitocôndrias desnaturam pelo congelamento, causando danos ao metabolismo celular; e por fim, os efeitos do descongelamento, porque após o congelamento, há um aquecimento tecidual, a água intracelular está muito gelada (-21 a -22°C) e com o descongelamento lento há a entrada de água extracelular (que degela mais rápido) nas células, causando ruptura das mesmas.

A desnaturação das proteínas ocorre pela exposição ao frio intenso. As membranas celulares têm ligações instáveis e sensíveis ao congelamento. A perda de fosfolipídios aumenta a permeabilidade da membrana celular, levando a célula ao aumento de volume e posterior lise. Este processo pode ocorrer tanto durante o congelamento quanto no descongelamento (GAGE; BAUST, 1998; BANSAL et al., 2012). Todas as membranas de uma célula, como as das mitocôndrias, microsomas e núcleo, sofrem danos pelo congelamento, devido à desnaturação dos complexos lipoproteicos (NISHIDA et al., 2011).

Cada tipo de enzima opera em uma temperatura regular média, o congelamento repentino age como inibidor, modificando o metabolismo celular, deixando a célula vulnerável a sofrer danos (LEOPARD, 1975).

Segundo Gage et al. (2009), a pedra angular da lesão celular direta por congelamento é a formação de cristais de gelo, que removem a água das células e leva a uma sequência de eventos deletérios. Investigações recentes *in vitro* e *in vivo* identificaram a apoptose, ou morte celular geneticamente regulada, como um mecanismo de lesão direta. As células da porção central da lesão sofrem necrose pela ação criógena e as células da porção periférica sofrem apoptose, que em geral ocorre de 8 a 12 horas após o congelamento. Ainda de acordo com os autores, a apoptose ocorre ao redor da área necrótica, mas a fronteira entre estes dois eventos não está bem definida (MACCINI et al., 2011).

Outro evento envolvido é o choque térmico, que se refere à lesão celular causada pela mudança brusca de temperatura, que ocorre independentemente dos outros efeitos diretos do congelamento. O choque térmico acontece pela variação de capacidade de expansão das membranas dos vários componentes celulares, que se rompem durante essa mudança de temperatura (NISHIDA et al., 2011; BASAL et al. 2012).

Efeitos Indiretos do congelamento são os efeitos vasculares, que ocorrem entre 1 e 2 horas após a criocirurgia, o fluxo sanguíneo é reduzido e este dano é intensificado nas próximas 24 horas (LEOPARD, 1975; GAGE; BAUST, 1998; GAGE et al., 2009). A principal alteração que ocorre nessa fase é a aglutinação, tamponamento e aderência de células vermelhas entre si e à parede do vaso (NISHIDA et al., 2011). O resultado dessa estase vascular leva à trombose e à isquemia, seguidas de hipóxia ou até mesmo anóxia, mudança de pH e morte celular (LEOPARD, 1975; MACCINI et al., 2011; NISHIDA et al., 2011). Logo, o efeito do

congelamento sobre os vasos é claramente importante e, talvez, o fator determinante na morte celular (GAGE et al., 2009).

A anóxia celular consequente da perda de circulação é considerada o principal mecanismo de lesão na criocirurgia (NISHIDA et al., 2011). Após o descongelamento dos tecidos, a estase microcirculatória se desenvolve rapidamente. A resposta inicial à refrigeração do tecido é a vasoconstrição, redução e até interrupção do fluxo, quando o congelamento é completo (GAGE; BAUST, 1998; NISHIDA et al., 2011).

Hoffmann e Bischof (2002) explicaram os eventos teciduais na fase de descongelamento. Segundo os autores, com a temperatura próxima de 0°C, há o retorno da circulação. Nesta fase ocorre vasodilatação, hiperemia e aumento da permeabilidade vascular, causando um edema que progride por algumas horas. Na sequência, desenvolve-se uma lesão na junção endotelial pela destruição celular e distensão vascular provocada pelo congelamento e liberação de radicais livres no momento da reperfusão tecidual. Como os tecidos ficam privados de sangue durante o congelamento, as células liberam fatores vasoativos após o descongelamento, causando vasodilatação e reperfusão. As lesões endoteliais além de agravarem o aumento da permeabilidade e edema já presentes, provocam agregação plaquetária, formando microtrombos e consequente interrupção da circulação em, aproximadamente, 30 a 35 minutos a contar do descongelamento. A perda de suprimento sanguíneo priva o tecido de qualquer possibilidade de vida, resultando em necrose uniforme, exceto na periferia da área submetida ao congelamento (HOFFMANN; BISCHOF, 2002; MACCINI et al., 2011; NISHIDA et al., 2011).

A área deficientemente perfundida é sempre menor que a área congelada e será ainda menor se próximo a ela houver uma artéria calibrosa (GAGE et al., 2009). Histologicamente, todo o processo, desde o congelamento até a necrose isquêmica, assemelha-se a um infarto, havendo apenas uma linha tênue de divisão entre o tecido normal e aquele congelado. Apenas a microcirculação é comprometida, as grandes artérias vão manter sua função mesmo após o congelamento (GAGE; BAUST, 1998; BASAL et al., 2012).

Segundo Leopard (1975), outro efeito indireto é o imunológico, que envolve a liberação de substâncias antígenas no interior das células quando da ruptura das membranas celulares pelo frio ou pelo fato do gelo produzir alterações estruturais que transformem componentes celulares normais em antígenos. A fase tardia ou imunológica é de especial interesse no tratamento de neoplasias malignas (NISHIDA

et al., 2011). Este fenômeno ocorre devido à formação de anticorpos antineoplásicos, pela ativação dos linfócitos-T citotóxicos e pela liberação de citocinas, resultando na alteração da constituição antigênica das células. Desta forma, o sistema imune seria sensibilizado pelo tecido destruído e estimulado a combater células remanescentes, que não foram destruídas totalmente pelo procedimento criocirúrgico (GAGE; BAUST, 1998; HOFFMANN; BISCHOF, 2002; MACCINI et al., 2011).

Segundo Maccini et al. (2011), a liberação de mediadores vasoativos resulta no influxo de células inflamatórias, principalmente neutrófilos e macrófagos, para o local da lesão. Segue-se por um processo de "limpeza" contínuo que pode durar de semanas a meses. Uma necrose por coagulação é observada no centro do local da criocirurgia, com a presença de neutrófilos na zona periférica.

Outro efeito deletério da hipotermia na periferia da lesão criotratada seria provocado pelo aumento da apoptose e pela destruição dos clones de células neoplásicas, ambos os eventos mediados pela resposta imunológica (GAGE et al., 2009). Os mecanismos de apoptose na zona periférica da criolesão ainda não estão bem estabelecidos (HOFFMANN; BISCHOF, 2002). Uma hipótese atual aponta o dano mitocondrial como ativador da cascata de caspases, pois estas enzimas são essenciais para morte celular programada (MACCINI et al., 2011).

Hoffmann e Bischof (2002) relatam a possibilidade de um aumento do nível sérico de anticorpos, mas sem inibição do crescimento do tumor e, em alguns casos, até um crescimento maior dos tumores malignos.

A taxa de congelamento, para ser mais letal às células, deve ser alta, isto é, um congelamento rápido (GAGE et al., 2009). O que implica baixas temperaturas em curto espaço de tempo (HAUSAMEN, 1975; LEOPARD, 1975; POSWILLO, 1978), pois promove maior quantidade de cristais intracelulares (WHITTAKER, 1986; GAGE et al., 2009; BANSAL et al., 2012).

Quando o congelamento ocorre rapidamente, a célula não é capaz de perder água para o meio externo para manter o equilíbrio, formando-se então, uniformemente, cristais de gelo intra e extracelulares (HAUSAMEN, 1975; GAGE; BAUST, 1998; GAGE et al., 2009; BANSAL et al., 2012). Os cristais intracelulares podem provocar destruição mecânica da membrana celular ou das organelas, como resultado de seus coeficientes de distensão térmica (EMMING et al., 1967; POSWILLO, 1978; WHITTAKER, 1986). O dano físico é imediato (LEOPARD; POSWILLO, 1974), sendo mais destrutivo do que o congelamento lento, pois promove

a formação de gelo intra e extracelular, com efeitos diretos em todos os substratos celulares (LEOPARD, 1975; HAUSAMEN, 1975; BANSAL et al., 2012).

Quando o processo de congelamento é lento, ocorre, primeiramente, a formação de cristais no meio extracelular (EMMINGS et al., 1967; HAUSAMEN, 1975; LEOPARD, 1975; TAL, 1982; POGREL, 1993), onde são menos letais, mas provocam desequilíbrio osmótico (GAGE; BAUST, 1998). À medida que os cristais aumentam de tamanho, ocorre a absorção da água extracelular, que, então, não mais poderá ser utilizada como solvente para as células. Há um aumento da concentração iônica extracelular que, conseqüentemente, provoca a saída de água do interior da célula, devido à diferença de osmolaridade. Esta perda de água pela célula eleva a quantidade de eletrólitos no seu interior, deixando-os em níveis tóxicos e letais (EMMINGS et al., 1967; LEOPARD; POSWILLO, 1974; HAUSAMEN, 1975; POSWILLO, 1978; POGREL, 1993; GAGE; BAUST, 1998).

Provavelmente os mecanismos de formação de cristais intracelulares e extracelulares coexistam em um mesmo tratamento, pois depende da temperatura alcançada em cada região da área total que está sendo tratada (LEOPARD, 1975; POGREL, 1993; BANSAL et al., 2012).

O congelamento rápido ocorre, principalmente, na região em contato direto com a ponta da sonda (LEOPARD, 1975). Muitas vezes o congelamento mais lento ocorre nas zonas que estão mais distantes da fonte de congelamento, isto é, na zona fora da bola de gelo formada no momento da aplicação do agente criogênico (LEOPARD, 1975; TAL, 1982)

Há zonas onde o resfriamento pode não ser capaz de promover cristais nem intracelulares nem extracelulares, não ocasionando o conseqüente evento de destruição celular (LEOPARD, POSWILLO, 1974; HAUSAMEN, 1975). Sabe-se que a destruição celular é alcançada com as temperaturas baixas, mas a temperatura nos tecidos não é tão fria quanto na ponta do aparelho utilizado (EMMINGS et al., 1967). Células localizadas na periferia do local de aplicação do agente criogênico congelam mais lentamente e em menor profundidade, pois estão relacionadas a um contínuo aquecimento proveniente de vasos sanguíneos. Fator este que interfere na baixa da temperatura do local. Quanto mais vascularizada a região mais difícil é o congelamento da área (LEOPARD; POSWILLO, 1974, LEOPARD, 1975).

Um fator que também contribui para a destruição celular é a taxa de reaquecimento do tecido após ter sido congelado (GAGE et al., 2009). Isto é, o tempo

que o tecido leva para descongelar e se reaquecer (HAUSAMEN, 1975, POSWILLO, 1978; BANSAL et al., 2012).

Os eletrólitos, que aumentaram de concentração no interior da célula, no processo de reaquecimento celular promovem uma entrada de água, resultando em edema e ruptura celular (LEOPARD, POSWILLO, 1974; LEOPARD, 1975; BANSAL et al., 2012). Com o reaquecimento e o descongelamento lento dos tecidos, promove-se um meio líquido, que é importante para que ocorram as reações de desnaturação das proteínas (POSWILLO, 1978; BANSAL et al., 2012). Os cristais de gelo formados em temperaturas muito baixas são de pequeno tamanho e crescem como resultado de sua recristalização que ocorre no período de reaquecimento. Tornando-se de maior tamanho, os cristais causam ruptura das organelas e membranas, levando à morte celular (HAUSAMEN, 1975; NISHIDA et al., 2011). Estes acontecimentos explicam o fato do reaquecimento tecidual, no processo de destruição celular, ser tão importante quanto o congelamento (EMMINGS et al., 1967; LEOPARD, 1975).

O processo de recristalização e as reações de desnaturação proteica dependem de um período de reaquecimento prolongado (HAUSAMEN, 1975; BANSAL et al., 2012). Caso o descongelamento ocorra rapidamente, os pequenos cristais irão apenas derreter, logo não haverá dano mecânico à célula. Portanto, pode-se dizer que o descongelamento lento causa maior dano celular que o descongelamento rápido (EMMINGS et al., 1967; LEOPARD, 1975; GAGE et al., 2009; NISHIDA et al., 2011; BANSAL et al., 2012).

A repetição de ciclos produz mais destruição tecidual, pois as células são submetidas às adicionais mudanças deletérias ao passar novamente por condições térmicas danosas. Em cada ciclo sucessivo, o resfriamento tecidual é mais rápido e o volume de tecido congelado é maior. A ruptura dos elementos celulares e membranas, no primeiro ciclo de congelamento/aquecimento, pode ser o responsável por um evidente aumento na condutividade térmica tecidual no segundo ciclo. Desta forma, ciclos sucessivos aumentam a necrose tecidual resultante (EMMINGS et al., 1967; GAGE; BAUST, 1998; BANSAL et al., 2012).

Definiu-se, então, que um rápido congelamento, seguido de um reaquecimento lento, sendo em média o dobro do tempo do congelamento, é o mais desejado, e que, repetidos ciclos de congelamento/reaquecimento são o ideal para destruição tecidual (EMMINGS et al., 1967, LEOPARD, POSWILLO, 1974; HAUSAMEN, 1975; TAL, 1982; BANSAL et al., 2012).

Além dos efeitos celulares imediatos ao congelamento, importantes alterações ocorrem nos vasos sanguíneos circundantes (BANSAL et al., 2012). O aumento da permeabilidade capilar ocasiona distúrbio ou estase no fluxo sanguíneo em pequenas vênulas e arteríolas, o que ocorre nas primeiras duas horas pós-operatórias. Após poucas horas do congelamento formam-se microtrombos e surgem áreas de infarto. Apenas os vasos arteriais calibrosos permanecem funcionais, e, mesmo estes, apresentam um aumento na sua permeabilidade. Estas alterações vasculares aumentam o poder destrutivo e provavelmente contribuem para um maior volume de necrose tecidual (EMMINGS et al., 1967; LEOPARD, POSWILLO, 1974; HAUSAMEN, 1975; GAGE; BAUST, 1998; BANSAL et al., 2012).

A temperatura do tecido é um fator chave para a criolesão. A maioria dos tecidos vitais congelam a uma temperatura próxima a $-2,2^{\circ}\text{C}$. Contudo, para que ocorra a morte celular a temperatura deve estar abaixo de -20°C (LEOPARD, 1975; TAL, 1982; GAGE et al., 2009).

Entretanto, em lesões tumorais, tem-se sugerido vários intervalos de temperatura para se atingir a completa destruição celular. Os intervalos citados são de -20 a -30°C , de -40 a -50°C e de -60°C . A razão desta diferença reside nas diferentes células e tecidos envolvidos, assim como nas condições experimentais. As células cancerosas são mais resistentes e necessitam de ciclos repetidos de congelamento e descongelamento. Uma visão razoável é que as células congeladas a temperatura menor que -40°C são susceptíveis ao dano celular direto e a estase vascular terá um efeito destrutivo mais amplo (GAGE et al., 2009).

A temperatura alcançada no tecido é influenciada por diversas variáveis como natureza e tamanho da lesão e vascularização da área (GAGE et al., 2009; BANSAL et al., 2012). Não existem padrões rígidos de tempo de congelamento, pois este varia não apenas devido ao tipo de tecido ou lesão, mas também em função do aparato utilizado, o que torna difícil a acuracidade do cálculo desta temperatura e de seu efeito destrutivo (SAKO et al., 1972; LEOPARD, 1975; TAL, 1992; BANSAL et al., 2012).

O tamanho da criolesão depende de vários fatores. O número de aplicações, tempo de congelamento e reaquecimento dos tecidos, composição celular e vascularização local, profundidade do tecido a ser congelado, condutividade térmica, osmolaridade do tecido, agente criogênico utilizado, técnica de aplicação e aparelhagem utilizada, todos estes fatores influenciam na quantidade de destruição

celular (LEOPARD, 1975; TAL, 1982; GONGLOFF; GAGE, 1983; WHITTAKER, 1986; BANSAL et al., 2012).

Clinicamente, observa-se que alguns segundos após o início da aplicação de baixas temperaturas aos tecidos, há a visualização de seu congelamento pela formação de uma bola de gelo (BANSAL et al., 2012). Através da medida do tamanho desta bola é possível prever a quantidade de destruição tecidual, pela estimativa de que dois terços da porção interna da bola atingirão temperaturas letais às células (EMMINGS et al., 1967; TAL, 1982).

A formação da bola de gelo e seu subsequente aquecimento são seguidos pela formação de pequena hiperemia e edema dos tecidos tratados. A necrose superficial ocorre em 2 a 3 dias, mas a re-epitelização ocorre profundamente à descamação. O último tecido necrótico descama após 7 a 10 dias, expondo uma superfície em retardada re-epitelização, que completa sua cicatrização em 20 a 30 dias (GONGLOFF; GAGE, 1983);

2.6 Técnicas utilizadas

A aplicação do agente criogênico promove uma área branca, congelada, de superfície circular, como uma bola de gelo, que cresce durante aproximadamente um minuto, estabilizando seu tamanho em seguida. Neste momento, um equilíbrio de temperatura é alcançado. Após a interrupção da aplicação do agente criogênico, a bola de gelo começa a se descongelar, e o tecido a se reaquecer (LEOPARD; POSWILLO, 1974; TAL, 1982; GONGLOFF; GAGE, 1983 GAGE, 1998; SANTOS; SANT'ANA-FILHO, 2002; BELTRÃO, 2003; BORGES, 2005; FERNANDES et al., 2010; et al., 2012; VYASARAYANI et al., 2014).

Grimmett (1961) realizou um estudo para determinar a profundidade de destruição e necrose teciduais em lesões dermatológicas, especialmente a verruga vulgar, que foram congeladas. Este estudo avaliou microscopicamente a profundidade dessas lesões. A biópsia foi realizada de 1 até 5 dias após o congelamento. Observou-se que o nitrogênio líquido era o melhor agente criogênico para tratamento de lesões superficiais. Em lesões mais profundas a incompleta remoção ou as recorrências eram frequentes, mesmo aumentando-se o tempo de aplicação. As lesões foram

congeladas de 30 a 180 segundos. Em algumas lesões, simultaneamente à aplicação, se exerceu pressão ao redor da lesão com uma pinça hemostática, diminuindo, assim, a vascularização da área. A profundidade máxima de necrose encontrada foi de 2 mm, variando de 0,5 mm a 1,0 mm. Para o autor o nitrogênio líquido foi ineficaz para destruir a porção mais profunda de um nevus intradérmico, com trinta segundos de tratamento. Em sua opinião o congelamento não alcança grande profundidade por duas razões: a vascularização é abundante e não permite total congelamento, e, em segundo, a porção tecidual congelada limita, por si só, a propagação da temperatura, análogo ao fenômeno dos esquimós utilizarem os iglus para se protegerem do frio. A resposta tecidual depende da técnica e de cada paciente, e não se ganha muito em profundidade estendendo-se o tempo de aplicação. Porém, o uso de pinça hemostática, associada à aplicação do nitrogênio líquido, apresentou melhores resultados no tratamento de lesões mais profundas, pois diminuiu a vascularização da área e, assim, a fonte de aquecimento tecidual, permitindo maior congelamento. O autor concluiu que, teoricamente, a profundidade de destruição tecidual alcançada é de 2 mm e que esta não cresce mesmo quando aumentado o tempo de aplicação do agente criogênico.

Emmings et al. (1967) relataram o uso de crioterapia em algumas lesões benignas da boca, como hemangioma, tumor misto em palato, hiperplasia papilomatosa inflamatória e hiperqueratose. Usaram o sistema fechado de aplicação de nitrogênio líquido. Os pacientes relataram um mínimo de dor e não houve hemorragias nem complicações durante a cicatrização. Para a hiperplasia papilomatosa em palato, os autores realizaram o tratamento sobrepondo-se as áreas congeladas de forma a cobrir toda a extensão da lesão. O tempo de duração do procedimento foi de quinze minutos. Em dois dias, o tecido necrótico estava bem demarcado do tecido vital e, nos oito dias seguintes, ocorreu a descamação. A cicatrização foi completada em cinco semanas. Os autores citaram o uso de crioterapia em outros dois pacientes com hiperplasias papilomatosas inflamatórias, com resultados semelhantes. Para os autores, a temperatura alcançada nos tecidos depende do contato entre a sonda e o tecido e, quanto maior o tempo de congelamento, maior a área a ser congelada. Assim, quando a lesão é extensa, maior área congelada é alcançada com repetidas aplicações da sonda de modo que estas sejam superpostas. Citam ainda que as vantagens da crioterapia, em relação à

excisão cirúrgica, compreendem a ausência de sangramento, de dor pós-operatória e baixo risco de infecção.

Krashen, em 1970, utilizou a criocirurgia para tratamento de lesões herpéticas em cavidade bucal e encontrou uma diminuição da quantidade de vírus com redução das lesões em 2 ou 3 dias, sugerindo ser esta técnica uma boa opção terapêutica para esta patologia.

Getter e Perez (1972) trataram 12 pacientes portadores de hiperplasias papilomatosas inflamatórias com crioterapia pelo sistema fechado. As lesões foram fotografadas inicialmente para posterior comparação. A sonda foi aplicada na área da lesão por 45 segundos. Isto levava à formação de uma bola de gelo. Após o desaparecimento dos sinais de congelamento, outra aplicação era realizada, exatamente igual à primeira. Após duas aplicações no mesmo local, outra área era escolhida e submetida ao mesmo tratamento. O procedimento foi realizado sem nenhum tipo de anestesia. Não houve sangramento durante ou após o tratamento. Alguns pacientes reclamaram de pequena dor no pós-operatório, a qual foi aliviada com analgésicos não opioides. A cicatrização ocorreu em três semanas. Os autores concluíram que o uso dos criógenos não produz qualquer dano ao osso subjacente. Afirmaram ainda que a crioterapia é preferível, pois é de fácil execução, não necessita de anestesia local, apresenta mínimo desconforto pós-operatório (quando comparado a eletrocirurgia e curetagem), ausências de sangramentos, de contaminações cruzadas, de infecções e de odores indesejados (comum na eletrocirurgia).

Hurt et al. (1972) estudaram a utilização da criocirurgia para tratamento de doença periodontal. Trataram um caso de paciente com periodontite e sangramento gengival com crioterapia. Cada área foi congelada duas vezes por 1 minuto, a uma temperatura de -65°C , com tempo de reaquecimento de 1 minuto. Não houve desconforto pós-operatório, sangramento ou complicações. Clinicamente observou-se eritema logo após o descongelamento. Em 4 dias havia ulceração e em 10 dias a gengiva apresentava-se clinicamente sadia com algum edema residual. Houve também diminuição da profundidade de sondagem em algumas das bolsas após 3 meses. Biópsias foram feitas durante todo o período de acompanhamento para análise histológica dos danos teciduais. Imediatamente após o congelamento, foi observada metacromasia celular, edema e vesículas na camada basal e hiperemia. Aos três dias havia ulceração na superfície externa, exsudato inflamatório composto em sua maioria por neutrófilos, edema e hemorragia no tecido conjuntivo, alterações

teciduais próximas à úlceração e presença de células gigantes junto à camada basal. As alterações não apresentavam caráter neoplásico. Aos quatro dias podiam-se observar as mesmas alterações com mais invasão de neutrófilos e abscesso subepitelial. Em sete dias havia completa cobertura do tecido conjuntivo por tecido epitelial com mínimo distúrbio da estrutura gengival. Em seis meses não havia sinais de intervenção criocirúrgica e o epitélio apresentava-se intacto. Os autores concluíram que o congelamento afetou mais a parte superficial da gengiva e que a cicatrização ocorreu rapidamente. As bolsas mais profundas necessitariam de congelamento mais profundo, mas isso poderia provocar danos ao osso alveolar.

Sako et al. (1972) realizaram tratamento pela criocirurgia de seis pacientes com leucoplasia em cavidade bucal situadas em língua, mucosa jugal, palato duro, palato mole e assoalho bucal. As lesões variavam de discretas e únicas a lesões extensas, envolvendo múltiplas áreas. O tempo de aplicação do agente criogênico variou de 30 segundos a vários minutos, dependendo da espessura da lesão e da vascularização da área. A área de necrose foi julgada pelo tamanho da bola de gelo que se formava. As áreas adjacentes que não deveriam ser congeladas eram protegidas com gaze e esponjas. O edema apareceu imediatamente após o tratamento, aumentando nas seguintes 24 a 48 horas. Uma descamação da lesão e da mucosa ao redor foi evidenciada após 3 a 4 dias. A cicatrização foi completa entre 10 dias a 2 semanas. Segundo os autores a aceitabilidade da técnica pelo paciente é excelente, alguns pacientes relataram certo desconforto para comer, porém não foi necessário o uso de analgésicos. Estes atribuíram algumas vantagens da criocirurgia, comparando-se com a cirurgia convencional, como a facilidade da técnica, ausência de dor, não necessitando o uso de anestésicos, a ausência de sangramento e a ausência de formação de uma cicatriz fibrosa. Porém, o maior ou menor alcance da bola de gelo varia a depender da natureza da lesão, seu aspecto físico, suas características teciduais, seu tamanho e da vascularização da área que se está congelando. A profundidade de congelamento pode ser aumentada com pressão exercida entre a sonda e o tecido. Pode haver relutância em se optar pelo uso do congelamento excessivo em lesões benignas devido ao prolongado tempo de cicatrização, mas, baseados em suas experiências, os autores preferem um congelamento excessivo resultando em adequada descamação da área desejada à permanência de remanescentes da lesão.

Leopard e Poswillo (1974) descreveram técnicas de aplicação da crioterapia em lesões bucais benignas com a utilização de agulhas termométricas, tendo como objetivo medir a temperatura no local e ter previsão da área necrosada. Todavia, a técnica preconizava o posicionamento das agulhas ao redor de toda a bola de gelo, conectada a vários medidores, o que tornava a técnica difícil. Não houve necessidade de anestesia para a grande maioria dos casos. Para melhorar a condutividade térmica, as lesões foram impregnadas com um gel solúvel em água. De acordo com os autores, a sonda deveria ser aplicada firmemente na superfície da lesão. Para a maioria das lesões benignas, dois ciclos de 2 minutos de congelamento, intercalados por um período de reaquecimento espontâneo, foram quase sempre suficientes para destruir a área desejada. Porém três ou mais ciclos seriam necessários para lesões malignas. Em lesões hiperplásicas, com grande aumento tecidual, o tempo de congelamento também deveria ser maior que 2 minutos. Nos hemangiomas capilares da face os melhores resultados foram alcançados com pequenos ciclos de 10 segundos, pois, os ciclos de 20 segundos provocavam necrose superficial da pele. Nas leucoplasias deveriam ser utilizados dois ciclos de dois minutos de congelamento.

Leopard (1975) utilizou a criocirurgia para o tratamento de lesões como: máscaras vasculares, lesões pigmentadas, hiperkeratoses, leucoplasias, granulomas, hiperplasias e cistos mucosos. Com uma casuística de trezentos pacientes, observou que o sistema aberto foi mais efetivo em lesões espessas ou proliferativas, onde o controle da profundidade foi secundário, e para lesões ósseas. O autor também relatou que os sistemas fechados ofereceram melhor controle, mas atingem uma profundidade de congelamento menor. Um tempo rígido de congelamento não poderia ser estabelecido como padrão, pois outros fatores estariam presentes, tais como natureza, aspecto e espessura dos tecidos normais e patológicos, bem como a variação da temperatura entre as sondas de aplicação. Como valores aproximados, a maioria das lesões responderam de maneira satisfatória a dois ciclos de 45 a 60 segundos de congelamento. Hemangiomas cavernosos foram tratados com ciclos maiores, de 1 minuto e 30 segundos. Já em hemangiomas capilares, ciclos mais curtos foram usados, uma vez que a única intenção foi causar estase sanguínea e formação de microtrombos nos capilares. Em outro extremo, para a destruição de lesões invasivas, foram necessários três ciclos de congelamento e reaquecimento, de 2 a 3 minutos cada. Nenhuma intolerância ou resistência às repetições do tratamento foi relatada, portanto, o tratamento pôde ser fracionado,

promovendo, desta forma, uma necrose gradativa e minimizando os possíveis efeitos secundários. Os eventos clínicos pós-operatórios começaram na primeira hora, com edema e hiperemia local. Em 1 dia, a superfície epitelial é coberta por um coágulo amarelado ou por uma fina crosta. A cicatrização é por segunda intenção e a re-epitelização do local ocorre entre 2 e 3 semanas. A cicatrização é inerte, provocando mínima resposta inflamatória periférica, e infecção ou hemorragia são raras.

Hausamen (1975) utilizou um tempo de congelamento de 30 segundos a 1 minuto, com uma temperatura de -90°C , no tratamento de lesões bucais superficiais de 66 pacientes, por um período de estudo de três anos. Em tumores mais invasivos, o tempo utilizado foi de 3 minutos, com uma temperatura da sonda de -160°C . O autor relatou suas experiências em lesões como: leucoplasias, hemangiomas, hiperplasias e carcinomas da mucosa bucal. Observou que a área necrosada corresponde, aproximadamente, a região congelada. Baseado em sua experiência clínica, o autor indicava o sistema aberto, tipo *spray*, apenas em lesões extrabucais e para lesões intrabucais somente as pontas do sistema fechado.

Jarzab (1975) utilizou, em 50 pacientes, o dióxido de carbono líquido, aplicado com uma sonda de fabricação própria no tratamento de hemangiomas envolvendo face ou cavidade bucal. A aplicação do agente criogênico em cada paciente durou de 2 a 5 minutos, em dois ciclos. Hiperemia e edema foram observados em 24 horas, e uma zona necrótica bem delimitada pôde ser vista. O período de cicatrização ocorreu com mínima dor e sem formação de cicatriz, em duas a seis semanas. Segundo o autor, a criocirurgia é uma técnica útil para o tratamento de hemangiomas, especialmente em pacientes de risco, nos quais doenças associadas, ou idade avançada, podem contraindicar a cirurgia convencional. Não foi necessário o uso de anestésicos e a cicatrização foi excelente do ponto de vista estético.

Marciani e Trodahl (1975) relataram a possibilidade de ocorrer sequelas estéticas e funcionais, exposição de osso alveolar, fratura patológica, linfadenopatia persistente e osteorradioneecrose, em áreas previamente irradiadas com o uso da criocirurgia. O atraso na cicatrização e a presença de cicatrizes extensas foram ocorrências comuns no estudo. Pode ocorrer uma cicatrização fibrosa na região vestibulo bucal, alterando a extensão da abertura bucal, e conseqüentemente, dificultando a fala. Quando esta cicatrização ocorre na língua e na faringe, pode prejudicar a fala e a deglutição. A exposição do osso mandibular lingual pode interferir com a substituição da prótese total inferior. A presença de linfadenopatia persistente

pode ser um fator complicador em pacientes tratados de câncer oral, pela alteração dos linfonodos cervicais. Por estas razões, os autores não aconselham o congelamento de lesões benignas que podem ser removidas com excisão cirúrgica, seguido de sutura e cicatrização por primeira intenção.

Poswillo (1978) sugeriu o uso de anestésicos locais contendo vasoconstritores, no tratamento de lesões vasculares, para reduzir o efeito competitivo do reaquecimento proporcionado pela vascularização local. Esta associação facilitou o congelamento da área, promovendo uma necrose mais profunda. A maioria das lesões superficiais da cavidade bucal foram tratadas pressionando a sonda sobre a lesão até a formação da bola de gelo e sua permanência em tamanho estático por 30 segundos. Seguiu-se o reaquecimento por cinco minutos, em seguida a sonda foi aplicada mais uma vez. O autor advertiu que nem todas as lesões respondiam de forma exatamente igual, e a experiência do cirurgião deveria orientar o tempo de congelamento e descongelamento e o número de aplicações necessárias para que se tenha total eliminação da lesão.

Gage (1978) avaliou a temperatura para destruição tecidual, em mucosa palatina de cães. O congelamento foi realizado com um aparelho contendo nitrogênio líquido, como agente criogênico, e sua aplicação foi realizada através de uma sonda. A temperatura da sonda foi alterada em -40°C , -80°C , -120°C e -160°C . A temperatura alcançada no local, durante o congelamento, foi medida por três agulhas, ligadas a um aparelho tipo termômetro, colocadas em pontos diferentes. O congelamento promoveu uma área branca, congelada, de superfície circular, como uma bola de gelo, que cresceu aproximadamente durante 1 minuto, estabilizando seu tamanho logo em seguida. Neste momento, um equilíbrio de temperatura foi alcançado entre a sonda e o tecido. Foi observado que quanto maior o tempo de contato da sonda e mais baixa a sua temperatura, maior a zona congelada e mais baixa a temperatura atingida nos tecidos. Um grande número de diferentes temperaturas foi encontrado em condições equivalentes. As variações foram atribuídas ao maior ou menor contato da agulha inserida no tecido, ao deslocamento da agulha, como também as diferenças de temperaturas nas diversas áreas da mucosa palatina. Concluiu-se que a temperatura para destruição tecidual deveria ser menor que -50°C . A extensão da lesão correspondeu, aproximadamente, à área congelada. Verificou-se que ciclos duplos causaram maior dano ao tecido. Sequelas após a cicatrização dependeram da severidade da destruição tecidual. Áreas menores de necrose foram acompanhadas

de reação inflamatória que desapareceram em poucas semanas, enquanto áreas de destruição moderadas apresentaram regeneração em 1 a 2 meses.

Reade (1979) afirmou que após a estabilidade alcançada pela bola de gelo, deve-se manter a sonda por mais 2 minutos e depois deixar o reaquecimento da lesão ocorrer de forma espontânea. Pode haver dificuldade em se julgar a extensão da área necrosada, e em alguns casos, o tecido patológico pode permanecer e resultar em recidiva da lesão. Recomenda-se, então, realizar o congelamento de uma área maior do que a lesão, englobando as margens de tecido saudável. Outro problema seria o volume da lesão, que poderia ser maior do que a capacidade de congelamento da sonda. Nestes casos de lesões extensas, poder-se-ia repetir o procedimento quantas vezes fossem necessárias. Para o autor, o sistema aberto é de difícil controle em seu uso, produz um congelamento maior e mais profundo da área, sendo mais indicado para lesões proliferativas espessas ou lesões invasivas do osso. O sistema fechado possibilita uma utilização mais precisa, sendo utilizado para lesões menores. O nitrogênio líquido, embebido em algodão, poderia ser usado para tratamento de lesões superficiais da mucosa bucal. O edema, devido ao acúmulo de exsudato, é comum após a criocirurgia, porém se resolve em poucos dias. No entanto, em procedimentos em base posterior de língua e em orofaringe, o paciente deve ser submetido à internação hospitalar para observação por no mínimo dois dias. A dor pós-operatória quase não existe, e se houver pode ser solucionada com analgésicos. Para o autor, a criocirurgia é um método de tratamento adicional e vantajoso, que pode ser escolhido como alternativa nos casos em que a cirurgia convencional está contraindicada.

Gongloff et al. (1980) observaram os efeitos da crioterapia em 24 pacientes, sendo 15 portadores de carcinoma *in situ* e 9 com hiperplasia pseudoepiteliomatosa. Foram utilizados os sistemas aberto (*spray*) e fechado (sonda). Na técnica com *spray*, o nitrogênio líquido foi aplicado sobre toda a lesão, promovendo o congelamento por inteiro. Quando se utilizou a sonda, esta deveria corresponder aproximadamente ao tamanho da lesão, sendo pressionada sobre sua superfície, promovendo o congelamento. Com as duas técnicas, o congelamento deveria ser realizado até que a lesão e uma margem de tecido sadio fossem congelados, para garantir que toda a lesão fosse destruída. Em alguns tipos de lesões, foi necessário 1 minuto ou mais para que ocorresse o congelamento completo da área desejada. O *spray* foi utilizado em lesões extensas, superficiais e em superfícies irregulares, e a sonda em lesões pequenas, planas e com tamanho aproximado ao da sonda. O sistema fechado

apresentou vantagens sobre o aberto em lesões na região posterior da cavidade bucal e na orofaringe. A experiência clínica dos autores demonstrou que a criocirurgia, quando executada com a técnica adequada, pode apresentar resultados satisfatórios no tratamento das lesões benignas da cavidade bucal.

Tal et al. (1982) utilizaram a crioterapia como tratamento de uma extensa lesão leucoplásica, em mucosa jugal e vestíbulo bucal superior. Uma sonda capaz de atingir a temperatura de -70°C foi utilizada com aplicações seriadas, começando por uma pequena área e estendendo-se sequencialmente. O tratamento durou 10 semanas, resultando num total de sete aplicações, com dois ciclos de 2 minutos de congelamento e intercalados por 1 minuto de reaquecimento. Observaram clinicamente a aparição de eritema 5 minutos após o congelamento que permaneceu por 3 horas. Não foi observado edema. Nas 24 horas seguintes, o edema local se desenvolveu e, em 3 dias, havia necrose superficial. Após 1 semana a área amarelada de necrose descamou, deixando uma superfície granulomatosa limpa e parcialmente coberta por epitélio. A completa cicatrização demorou de 3 a 4 semanas sem sintomatologia dolorosa e com uma regeneração livre de cicatriz, apresentando um tecido normal mole e flexível. Após a cicatrização, não foram encontradas diferenças na sensibilidade dolorosa, tátil ou na percepção da temperatura na área operada. Três meses após o início do tratamento, parte da região tratada e uma pequena área ceratinizada, adjacente a primeira área que foi submetida à crioterapia, foram removidas cirurgicamente e preparadas para análise histológica. Os autores concluíram que a criocirurgia é uma boa opção para tratamento de lesões ceratinizadas extensas da mucosa bucal, pois um epitélio ceratótico e com displasia e totalmente sem glicogênio foi substituído por um epitélio normal e não ceratinizado ou paraceratinizado com distribuição normal de glicogênio. Outros métodos de tratamento poderiam necessitar de enxerto e a fibrose cicatricial poderia causar perda de função.

Gongloff e Gage (1983) trataram 14 casos de lesões variadas na cavidade bucal usando ambos os sistemas, aberto ou fechado, de aplicação criogênica. As lesões incluíam mucocelos, hemangiomas, hiperplasias, leucoplasias e carcinoma *in situ*. Os pesquisadores utilizaram diversos protocolos de criocirurgia, no entanto respeitaram os princípios de rápido congelamento seguido de um período de reaquecimento da área. O protocolo de aplicação variava de acordo com o tamanho, localização e tipo de lesão a ser tratada, sendo a sonda usada para lesões menores

que 1 cm e o *spray* para lesões maiores que 1 cm . O tempo total de tratamento durou 12 minutos, em média. Clinicamente foi observado que hiperemia e edema moderados surgiam logo após a criocirurgia. A necrose superficial geralmente aparecia entre 2 e 3 dias pós-operatórios com processo de re-epitelização logo abaixo desta camada. O tecido necrosado esfoliava entre 7 e 10 dias, expondo a superfície de reparo, que cicatrizava completamente entre 20 e 30 dias. O tecido cicatricial era mole e flexível com aparência lisa e pálida. Nenhuma perda funcional foi observada. Todos os casos foram acompanhados por três anos sem recorrência da lesão tratada. O tratamento foi livre de complicações como dor, hemorragia, infecção, danos às estruturas adjacentes e formação de cicatrizes. Os autores concluíram que os dois modelos de aplicação do crioterápico podem ser úteis para o tratamento das lesões orais, a sonda é melhor para lesões de difícil acesso na cavidade bucal e orofaringe bem como para lesões pequenas e o *spray* está mais indicado para áreas onde a visualização direta é possível e para lesões difusas superficialmente. Os autores observaram que, durante a utilização do *spray*, deveriam ser tomados cuidados com as áreas adjacentes ao local de aplicação para que não ocorra um congelamento iatrogênico destas.

Para Poswillo (1986), pelo fato da criocirurgia não apresentar acuracidade da quantidade de tecido que se necrosa, seu uso deve ser reservado como segunda opção, e não como substituto do tratamento convencional, para as lesões que a excisão não é a melhor escolha, como por exemplo: lesões vasculares, leucoplasias extensas, lesões associadas a agentes virais e cistos glandulares. Ainda segundo o autor, as lesões hiperplásicas podem ser tratadas com criocirurgia, porém a excisão cirúrgica também apresenta bons resultados. Além disso, quando esta lesão é extensa, o tratamento com criocirurgia é mais demorado, pois necessita de mais ciclos de aplicações e a ferida cicatriza por segunda intenção. Esta técnica deve ser reservada para pacientes de alto risco, pacientes idosos, pacientes com problemas de coagulopatia e que não podem ser submetidos à cirurgia convencional.

Tal e Gorsky (1987) fizeram uso da criocirurgia, através de sonda, para o tratamento de varizes bucais. A princípio, pretendiam realizar apenas um ciclo de congelamento com duração de 30 segundos. Entretanto, observaram que para envolver toda a lesão seria necessário sobrepor áreas, e algumas regiões foram congeladas por duas vezes. Os autores consideram a técnica simples, com mínimo

desconforto ao paciente. Durante dois anos de preservação, as varizes não recidivaram.

Tal et al. (1987), baseados em casuísticas descritas na literatura e em suas experiências em tratamento de lesões superficiais, resolveram testar a criocirurgia para despigmentação gengival, utilizando o óxido nitroso (-81°C). O agente criogênico foi aplicado primeiramente numa pequena área de 5 x 5 mm, obtendo-se bom resultado. O tratamento foi realizado por quadrantes, realizando o congelamento da gengiva com sonda, pelo tempo de 10 segundos, seguido de 1 minuto de reaquecimento e mais um ciclo de congelamento. A necrose superficial tornou-se aparente em 1 semana e a re-epitelização ocorreu em 2 semanas. Após 4 semanas a epitelialização estava completa. O acompanhamento clínico de 20 meses demonstrou que a pigmentação não retornou na área tratada. Os autores afirmaram que a ideia surgiu quando, tratando lesões em mucosa bucal de negros, acidentalmente afetou a gengiva e uma área de despigmentação foi observada. Concluíram que a criocirurgia, aplicadas por curto período, poderia destruir o epitélio oral sem causar danos significativos na lâmina própria subjacente. Defenderam que a criocirurgia deveria ser o tratamento de escolha para despigmentação gengival.

Li (1991) tratou 50 casos de carcinoma de língua. Pacientes com tumor maior que 2 cm de profundidade ou linfonodos com metástase foram excluídos. Todos os pacientes foram tratados pela primeira vez. A sonda foi aplicada por pelo menos dois ciclos de congelamento/reaquecimento. As margens da bola de gelo excederam as das lesões por 1 cm. O tempo de aplicação do nitrogênio líquido variou de 3 a 5 minutos de acordo com o tamanho da lesão. Através de termômetros inseridos na base do tumor, a temperatura de -40°C foi atingida em toda a extensão das lesões tratadas. Em três pacientes, nos quais a aplicação foi realizada próximo à base da língua, ocorreu edema excessivo que foi resolvido com uso de corticoides, sem necessidade de traqueostomia. Os pacientes foram acompanhados por 3 a 10 anos, 14 morreram (9 por metástase linfática cervical incontrolável e 5 de recidiva da lesão). O autor concluiu que a criocirurgia é superior aos métodos convencionais, pois esta apresenta menos riscos cirúrgicos em razão da rapidez de aplicação, pouco desconforto pós-operatório e cicatrização excelente. Para o autor, a criocirurgia poderia ativar a resposta imune contra o tumor, o que poderia levar ao desaparecimento de metástases não diagnosticadas. Além disso, também causaria

danos menores às estruturas anatômicas. A desvantagem da técnica seria a incapacidade do equipamento de atingir grandes profundidades.

Tal (1992) tratou seis casos de hemangioma em lábio com criocirurgia por óxido nítrico (-81°C), utilizando uma sonda proporcional ao tamanho da lesão. Estas variavam de 4 a 9 mm e situavam-se no vermelhão do lábio superior e inferior. Foram utilizados dois ciclos de congelamento de 40 segundos, com tempo de reaquecimento de 1 minuto entre ambos. Não foi necessário o uso de anestesia durante o procedimento. Após 1 hora da criocirurgia os pacientes apresentaram eritema e edema no local. O tecido necrótico que surgiu nos primeiros 7 dias esfoliou entre duas e quatro semanas, sendo totalmente epitelizada. A cicatrização ocorreu sem intercorrências, não deixando cicatriz. O completo desaparecimento da lesão ocorreu em 4 casos. Duas lesões maiores apenas reduziram em tamanho e não receberam tratamento adicional.

Turjansky e Stolar (1992) trataram 158 casos de diferentes patologias na cavidade bucal com criocirurgia. Foi utilizado o nitrogênio líquido para o tratamento de doze angiomas, três linfangiomas, seis granulomas piogênicos, uma mucocele, vinte lesões por HPV, dezesseis queilites, vinte leucoplasias, onze líquens plano, uma estomatite nicotínica, três hiperplasias papilares, dezenove carcinomas *in situ*, duas eritroplasias, vinte e três papilomas, vinte e um carcinomas espinocelulares, utilizando diversos protocolos de aplicação do agente criogênico. O método variava de acordo com o tipo, tamanho e profundidade da lesão. Para os angiomas e linfangiomas realizou-se o congelamento com sonda por 2 a 3 minutos. Para os granulomas utilizou-se o *spray* por 20 a 30 segundos. Em mucocelas utilizou-se a sonda por 15 a 20 segundos. Nas lesões por HPV utilizou-se o *spray* por 20 segundos. As queilites e leucoplasias foram tratadas com *spray* por 1 a 3 minutos. Para os líquens utilizou-se *spray* por 20 a 30 segundos. Em hiperplasia papilar, os autores realizaram exérese da lesão e congelaram a base com o uso do *spray* por 30 segundos. Nos casos de carcinomas *in situ*, intercalou-se sonda e *spray*, de forma a abranger toda a lesão, com tempo de congelamento sempre maior que 1 minuto. Para as eritroplasias utilizou-se o *spray* com três ciclos de 90 segundos cada. Para os papilomas o tempo variou de 120 a 180 segundos, utilizando o *spray*. Em algumas lesões malignas foi utilizada a radiocirurgia ou a cirurgia convencional para remoção da parte vegetante e logo em seguida foi congelada a base destas lesões. Os autores chegaram à conclusão que a criocirurgia sozinha ou conjugada com a cirurgia convencional ou

radiofrequência permite a extirpação de lesões benignas e malignas sem perda de substância. Isso significa preservar estruturas anatômicas. Outra vantagem foi que não houve dano ao tecido ósseo ou aos dentes próximos ao local operado. Neste estudo, a criocirurgia demonstrou ser um método valioso para tratamento de diversos tipos de lesão da cavidade bucal, sejam estas benignas ou malignas.

O tratamento de cistos de retenção mucoso, em lábio e base de língua, foi relatado por Toida et al. em 1993. Dezoito pacientes foram tratados com aplicação direta de nitrogênio líquido com haste de algodão sobre as lesões. Estas variavam de 2 a 7 mm de diâmetro. O nitrogênio líquido foi armazenado em garrafa térmica. O tamanho das hastes foi escolhido de acordo com o tamanho de cada lesão. Foram utilizados de 4 a 5 ciclos de 10 a 30 segundos de congelamento, seguidos por um período de reaquecimento de duas vezes maior que o de congelamento. Não foi necessário o uso de anestesia. Não houve dor pós-operatória, hemorragia, infecção ou formação de cicatriz. Uma desvantagem da técnica foi que algumas partes do tecido não sofreram uma necrose adequada, sendo necessário repetir algumas aplicações. Os autores afirmaram que a utilização das hastes de algodão foi vantajosa, pois apresentou baixos custos, boa aceitação do paciente e fácil adaptação ao tamanho da lesão, quando comparado às sondas.

Pogrel, em 1993, avaliou 37 pacientes com lesões ósseas mandibulares localmente agressivas (25 ceratocistos, 8 ameloblastomas, 2 lesões de células gigantes e 2 mixomas), no período de 1983 a 1990, tratados com enucleação, seguida de crioterapia com nitrogênio líquido, utilizando *spray* e sonda. Ao final, verificou 3 casos de deiscência da ferida com exposição óssea, e conseqüentemente sequestro ósseo, 1 caso de recidiva de ameloblastoma com fratura patológica, e 19 pacientes desenvolveram parestesia no pós-operatório, mas com resolução espontânea. O autor firmou que a crioterapia com nitrogênio líquido representa uma técnica singular para a desvitalização óssea *in situ*, mantendo a estrutura inorgânica e permitindo a substituição gradativa do osso necrótico por um tecido ósseo vital. Alertou também para a dificuldade de determinar a extensão exata da necrose tecidual.

Em 1997, Moraes e Biazolla compararam o tratamento da hiperplasia papilar do palato com a criocirurgia, com a terapêutica mucoabrasiva, com a eletrocirurgia e com a técnica de exérese com bisturi convencional. Para isto, foram selecionados 38 pacientes que apresentavam a lesão, e foram divididos em quatro grupos. Os autores concluíram que a criocirurgia é um método eficaz para o tratamento desta lesão, sendo

um procedimento simples, de rápida execução, baixo custo operacional e ótima aceitação pelos pacientes. A crioterapia foi o tratamento que menor obteve relato de dor pós-operatória.

Marcushamer et al. (1997) relataram o uso da criocirurgia, com o nitrogênio líquido aplicado com algodão, para o tratamento de mucocele em crianças. Cada lesão foi exposta de 8 a 10 aplicações consecutivas, com duração de 5 a 10 segundos, até que toda a lesão estivesse congelada. Após uma semana houve diminuição do tamanho das mucocelas e uma nova aplicação foi realizada, ocorrendo o desaparecimento das lesões em 1 semana. Não houve dor pós-operatória, sangramento ou infecção. De acordo com os autores, a criocirurgia foi uma ótima opção de tratamento para as mucocelas, principalmente em crianças, pois estas toleraram bem a técnica.

Ishida e Ramos-e-Silva (1998) fizeram uso a criocirurgia tanto pela técnica do *spray* como pela sonda, para diversas lesões de boca, tais como: granuloma piogênico, angioma, queilite actínica, ceratoacantoma, fibroma, lesões por HPV em pacientes imunodeprimidos ou não, líquen plano hipertrófico, leucoplasia e eritroplasia, carcinoma verrucoso, cisto mucoso e hiperplasia do palato, e relataram bons resultados. Dois ou três ciclos foram necessários. A criocirurgia foi considerada um procedimento seguro e de baixo custo. Corticoides poderiam ser administrados, por via oral ou intramuscular, antes da realização da criocirurgia para reduzir o edema, principalmente quando se realizam procedimentos em língua, assoalho bucal e região posterior da boca.

Lemos-Júnior (1999) utilizou a criocirurgia em 37 pacientes para tratamento de lesões bucais como: hemangiomas, mucocelas, rânulas, hiperplasias fibrosa inflamatória, papilomas, leucoplasias e líquens plano. Conforme o tipo, tamanho e forma da lesão selecionou-se a técnica de tratamento, sendo o *spray* empregado em lesões extensas e mal delimitadas, maiores que 2 cm e a sonda empregada em lesões menores, de até 2 cm. Em alguns casos, alternou-se entre um método e outro, segundo julgamento clínico. A aplicação variou de uma única sessão até três sessões distintas, com intervalos de 2 semanas. Em cada sessão utilizou-se dois a três ciclos de aplicação, procurando-se congelar toda a lesão, com um tempo mínimo de 20 segundos e um tempo máximo de 40 segundos. O resultado do tratamento com criocirurgia variou conforme o tipo de lesão. O autor ressaltou que as leucoplasias

poderiam ser tratadas por este método, porém, a chance de recidiva seria alta e os resultados imprevisíveis.

Thai e Sinclair (1999) relataram o uso da criocirurgia na dermatologia e odontologia. Diversas lesões de pele benignas, pré-malignas e malignas, assim como lesões de mucosa foram abordadas no estudo. Lesões vasculares, doenças fibróticas, infecciosas, por dano solar, acne, bem como alguns defeitos cosméticos são passíveis de tratamento pela crioterapia. O mecanismo de tratamento envolve dano do tecidual, estase venosa e inflamação para destruir tecido indesejado. Os efeitos colaterais são comuns, mas de curta duração e raramente são graves. A hipopigmentação da pele ou da mucosa pode ocorrer devido à maior sensibilidade dos melanócitos a lesão causada pelo frio. Isso seria importante em pacientes com pele mais escura. Temperatura mínima necessária para o dano celular é específica para cada célula, sendo os melanócitos sensíveis a temperaturas abaixo de -4°C . O equipamento necessário é relativamente econômico e facilmente disponível. A técnica é simples e reproduzível, fazendo criocirurgia uma opção atraente para muitas doenças de pele benignas.

Yeh (2000) tratou 102 lesões bucais, como mucocelos, leucoplasias, hemangiomas, fibromas, líquen plano erosivo e hiperplasia, utilizando hastes de algodão embebidas com nitrogênio líquido. Foi usada anestesia tópica com xilocaína para minimizar o desconforto e bloqueio regional para lesões maiores. A haste de algodão era mergulhada no criógeno por 1 a 2 segundos e aplicada na lesão com pressão por 30 a 60 segundos, em dois ciclos. Hiperemia e edema apareceram imediatamente após o tratamento. O edema aumentou entre 1 e 2 dias e regrediu entre 2 e 3 dias. As lesões tornaram-se necróticas entre 3 e 5 dias. Neste mesmo período, o reparo por granulação se iniciou. A epitelização completa ocorreu entre 1 a 4 semanas, dependendo da extensão da lesão. Não houve complicações durante o tratamento, nem hemorragia ou infecção. Em lesões remanescentes o tratamento foi repetido com uma semana de intervalo até não reincidirem mais. A quantidade de colágeno na cicatriz foi menor do que quando se usa o bisturi frio ou elétrico. A técnica envolve baixo custo, já que o nitrogênio líquido tem preço baixo. Além disso, não necessita sutura, não apresenta sangramento e não necessita anestesia na maioria dos casos. O autor também aplicou o nitrogênio líquido para tratamento de máculas melanóticas em 15 pacientes. As aplicações tiveram duração de 10 a 15 segundos. As máculas desapareceram em uma semana. A criocirurgia apresentou resultados

excelentes. Ainda há falta de precisão no procedimento, podendo haver dificuldade em se julgar a área final de necrose, porém o método pode ser repetido, quando necessário.

Ahmed et al. (2001) realizaram um estudo comparativo entre a aplicação de nitrogênio líquido com haste de algodão e com *spray*, no tratamento de verrugas de pés e mãos. Trezentos pacientes foram submetidos a este estudo e acompanhados por um período de 6 meses. Os autores concluíram que o nitrogênio líquido, no tratamento de verrugas vulgar, foi eficaz, tanto na aplicação com *spray* como na aplicação com haste de algodão.

Cerqueira e Sant'ana-Filho (2001) lançaram mão da crioterapia com nitrogênio líquido aplicado com *spray*, para o tratamento de mixoma odontogênico localizado na mandíbula, após curetagem da lesão. Foi utilizado gaze para proteção dos tecidos moles adjacentes. Os autores afirmaram que a crioterapia associado à curetagem oferece índices de recidivas muito menores, quando comparada ao tratamento conservador isolado, e pouca ou nenhuma seqüela estético-funcional, se comparado ao tratamento radical.

Em 2001, Schmidt e Pogrel realizaram um estudo, avaliando 26 pacientes com ceratocisto odontogênico, que haviam sido submetidos à enucleação e crioterapia. Vinte e dois pacientes já tinham recebido tratamento prévio através de enucleação isoladamente. Após a enucleação da lesão, os tecidos circundantes foram protegidos com afastadores metálicos e gaze e, a cavidade cirúrgica foi borrifada com nitrogênio líquido em dois ciclos de 1 minuto, com intervalo de 5 minutos para reaquecimento espontâneo. Onze pacientes receberam enxerto ósseo autógeno de crista ilíaca no mesmo tempo cirúrgico. Vinte e três pacientes não apresentaram evidência clínica ou radiográfica de recidiva. A complicação mais comum foi a deiscência da ferida. Um paciente apresentou fratura patológica da mandíbula no pós-operatório de seis semanas e três pacientes apresentaram recorrência das lesões. Os autores reforçaram que a principal vantagem da técnica de crioterapia com o nitrogênio líquido é a manutenção da arquitetura óssea, o facilita a neoformação óssea. Afirmaram ainda que os resultados deste estudo, empregando a criocirurgia, foram bastante encorajadores.

Santos e Sant'ana-Filho, em 2002, testaram diferentes protocolos de aplicação de nitrogênio líquido em mucosa dorsal da língua de ratos. Foram realizadas duas aplicações de 20 segundos, com intervalo de 5 minutos entre elas, usando os sistemas

fechado (sonda) e aberto (*spray* e haste de algodão). Os animais foram sacrificados seis horas após a criocirurgia e as amostras puderam ser analisadas histologicamente. Após o experimento, os autores concluíram que a aplicação do agente criogênico em *spray* não deveria ser utilizada na cavidade bucal por falta de previsibilidade na extensão do dano, além disso, provocou edema pronunciado e de difícil controle. A técnica por sonda foi mais segura, pois apresentou menor extensão do dano causado e provocou menor edema. Os autores não recomendam o uso da crioterapia na região posterior da cavidade bucal. A aplicação do nitrogênio líquido com haste de algodão foram mais brandas, sem alteração da forma anatômica da língua e com dano tecidual limitado ao local de aplicação. Porém o grande número de aplicações, às quais, muitas vezes, o paciente deve ser submetido pode não trazer vantagens em relação a outros tipos de terapia.

Beltrão (2003) analisou clinicamente os efeitos do nitrogênio líquido aplicado com hastes de algodão em lábios e palatos de coelhos. Realizou-se a aplicação de nitrogênio líquido com o sistema aberto através de dois ciclos de 1 minuto cada. Entre os ciclos de congelamento, esperou-se um período de 5 minutos para que houvesse um reaquecimento do local tratado. Utilizou-se 20 coelhos machos que foram divididos em grupo Lábio e grupo Palato de acordo com o local de criocirurgia. Os locais de aplicação tiveram sua espessura medida antes da criocirurgia e as bolas de gelo inicial e final também tiveram seus diâmetros aferidos. As lesões provocadas pelo frio foram acompanhadas até o seu reparo final nos seguintes períodos de observação: 1, 2, 3, 5, 7, 10 e 14 dias. Em cada período, foi medida a espessura do local tratado e o comprimento da lesão nos sentidos ântero-posterior e transversal. Também foram tiradas fotografias digitais para determinar quais manifestações clínicas ocorreram durante o reparo. Os resultados obtidos revelaram que não há diferença entre as bolas de gelo inicial e final entre os locais de aplicação; contudo, em Lábio a maior bola é a inicial e, em Palato, a final. No Lábio, a lesão aumenta no segundo dia e depois diminui até chegar ao tamanho encontrado no primeiro dia. No grupo Palato, a lesão aumenta no primeiro dia e diminui atingindo um tamanho menor do que o obtido inicialmente. Em relação à espessura do local de aplicação, em Lábio há um aumento significativo entre os dias 1 e 5, com o pico no segundo dia. Em Palato há um aumento somente no primeiro dia. Na análise das variáveis qualitativas verificou-se que o edema comporta-se de maneira semelhante à espessura em ambos os grupos. Equimose e hiperemia ocorrem nos primeiros dias. A necrose aparece no dia 1 e o reparo tecidual

ocorre no dia 14. Concluiu-se que: o protocolo utilizado produz necrose tecidual; é possível controlar o tamanho da bola de gelo do dano tecidual e do edema; a extensão do dano tecidual depende do local de aplicação; o padrão de destruição tecidual é o mesmo e a cicatrização ocorre em 14 dias.

Silva (2003) realizou um estudo em coelhos, utilizando 15 animais, em cujas mandíbulas direitas foram confeccionados defeitos ósseos, que foram protegidos com gazes ao redor. Posteriormente foram submetidos à aplicação de nitrogênio líquido em dois ciclos de 10 segundos cada, com intervalo de 2,5 minutos, enquanto os defeitos contralaterais serviam como controle. Os animais foram sacrificados em 2, 15 e 60 dias de pós-operatório para avaliação. Concluiu que o congelamento não ocorreu de forma homogênea e, que a aplicação de nitrogênio líquido não interferiu com a cronologia e processo de regeneração do tecido ósseo, mostrando-se efetivo quanto à necrose das paredes ósseas. Observou ainda que a penetração do congelamento, em relação às paredes ósseas do defeito cirúrgico foi de aproximadamente 2,5 mm.

Em 2004, Scortegagna e Sant´ana-Filho, avaliaram o grau de reparação óssea em defeitos cirúrgicos produzidos em mandíbula de coelhos, submetidos à aplicação de nitrogênio líquido e subsequente inserção de enxerto ósseo autógeno. Três grupos de 5 animais foram avaliados nos períodos de 2, 15 e 60 dias de pós-operatório. Os defeitos da hemimandíbula direita foram tratados com nitrogênio líquido, seguindo um protocolo de 2 ciclos de 10 segundos, com um intervalo de 2,5 minutos. Após a crioterapia, o defeito ósseo serviu como leito receptor para o enxerto proveniente da hemimandíbula contralateral. Os defeitos ósseos das hemimandíbulas do lado esquerdo não foram submetidos à crioterapia, no entanto, receberam enxerto proveniente do lado direito e utilizados como controle. Concluíram que o nitrogênio líquido provocou necrose óssea e atrasou o processo de reparo ósseo, porém isso não acarretou prejuízos na sequência deste processo ao longo do tempo, sendo indicado o emprego de enxertos ósseos em leitos cirúrgicos previamente tratados com nitrogênio líquido.

Borges (2005) avaliou o uso da crioterapia no tratamento da hiperplasia bucal associada ao uso de próteses. Avaliou também a dor trans e pós-operatória durante o tratamento, bem como aos tempos de duração das criocirurgias. Doze pacientes foram selecionados e submetidos à crioterapia com nitrogênio líquido, pelo sistema fechado, utilizando dois ciclos de 60 segundos, com um intervalo de três minutos para reaquecimento. Dos doze pacientes tratados, seis apresentaram resolução da lesão

(sucesso), três pacientes não apresentaram diminuição em seu tamanho (insucesso) e três pacientes não compareceram aos retornos, não podendo ser enquadrados na amostra. Concluíram que a crioterapia é um método eficiente para o tratamento de lesões hiperplásicas bucais pediculadas com até 12 mm de comprimento, porém não apresentou bons resultados em hiperplasias bucais sésseis com mais de 9 mm. Considerou o procedimento rápido, indolor, tanto no trans como no pós-operatório.

Shirani (2008) relatou a aplicação do nitrogênio líquido no tratamento de lesões labiais nodulares da síndrome da lipoiodoproteinase, doença metabólica hereditária caracterizada pela deposição de um material hialino amorfo (glicoproteína) na derme e no tecido conjuntivo submucoso. O diagnóstico foi confirmado por biópsia incisional, porém não foi possível realizar a sutura devido à consistência rígida da mucosa. O procedimento para remodelação do lábio foi realizado com anestesia local. Os nódulos do lábio superior foram tratados pela aplicação do criógeno a uma temperatura -63°C por 1 minuto, em duas etapas, sendo que em cada uma destas tratou-se uma metade do lábio. Para o controle da dor o paciente foi medicado com anti-inflamatório não esteroideal. Foi relatado dor por 1 semana e a cicatrização completou-se com 30 dias. Após o tratamento o aspecto do lábio era mais suave e estética melhor. Em um ano de acompanhamento nenhum nódulo novo foi formado, entretanto surgiram algumas fissuras no lábio. A aparência do lábio melhorou e a paciente ficou satisfeita com o resultado. Concluiu-se que a criocirurgia ofereceu vantagens sobre a cirurgia convencional, pois esta eliminou a necessidade de sutura na mucosa rígida da paciente e não apresentou sangramentos nos pós-operatórios. Além disso, melhorou a estética, a função e a autoestima da paciente.

Prasad et al. (2009) realizaram um estudo clínico retrospectivo de leucoplasias e mucoceles tratadas com nitrogênio líquido. Quarenta pacientes foram selecionados para o estudo. Vinte pacientes com leucoplasia e vinte com mucocele. Os autores descreveram uma técnica simples e econômica de crioterapia, utilizando copos descartáveis de plástico, hastes de algodão e nitrogênio líquido. Foi utilizado anestésico tópico em gel para minimizar o desconforto. Os tecidos vizinhos foram protegidos com gaze para evitar traumas desnecessários. A técnica consistia em mergulhar a haste de algodão no nitrogênio líquido de 1-2 segundos, aplicando-o sobre a lesão, com pequena pressão, durante 10 a 30 segundos por ciclo, seguido por um período de descongelamento com o dobro do tempo de congelamento. Segundo os autores, o tempo de congelamento/descongelamento depende do volume

e profundidade da lesão, bem como da experiência do cirurgião. Todo grupo com mucocele foi curado sem qualquer complicação ou recorrência, mas cinco pacientes com leucoplasia apresentaram recidiva. A causa deste insucesso foi atribuída aos hábitos do paciente. Concluíram que a técnica descrita de crioterapia é promissora e tem bons resultados, apresentando vantagens sobre as técnicas convencionais de tratamento.

Bublitz et al. (2010) avaliaram a resposta do tratamento crioterápico, em lesões hiperplásicas da cavidade bucal (fibromas e hiperplasias fibrosas) em 118 pacientes. Foi utilizado o nitrogênio líquido, armazenado em garrafa térmica adiabática, sob o sistema aberto. O protocolo de congelamento foi: primeiro ciclo com 10 cotonetes previamente embebido no criógeno, aplicados por 2 segundos na lesão, com intervalo de 5 minutos para reaquecimento tecidual; segundo ciclo, idêntico ao primeiro. Não foi constatado nenhum caso de infecção. Também não foi administrada nenhuma medicação tópica ou sistêmica para prevenir infecção. Vinte lesões não obtiveram sucesso (11 eram hiperplasias fibrosas inflamatórias, 8 fibromas e 1 verruga vulgar). A maioria dessas lesões eram maiores que 8 mm. Os autores relataram que a possível causa do insucesso foi o congelamento incompleto das lesões pelo uso de cotonetes, pois estes não englobam lesões maiores que 8 mm, sendo necessário aplicar em mais de um ponto. O número de sessões utilizadas no tratamento das lesões dependeu basicamente do seu tamanho. As lesões de até 10 mm obtiveram sucesso no tratamento com apenas uma sessão, enquanto que as lesões maiores requereram maior número de aplicações. Concluíram que crioterapia causa dor leve; promove a cura de lesões bucais sem causar defeitos estéticos ou cicatrizes; é eficaz no tratamento de lesões bucais de tecidos moles; e também evita as complicações da cirurgia convencional. O processo de reparo das feridas tratadas pela aplicação da crioterapia ocorreu, na maioria destas, aos 21 dias pós-operatórios.

Costa et al. (2010) revisaram 103 casos de lesões ósseas tratadas complementarmente pela criocirurgia e discutiram seus principais aspectos históricos, moleculares e terapêuticos. Os autores concluíram que a criocirurgia é uma terapêutica valiosa, muitas vezes efetiva, para a abordagem de lesões agressivas dos maxilares, cujo tratamento radical, na maioria dos casos, traz danos estéticos e funcionais ao paciente. Apesar de existirem diversos trabalhos inferindo sobre a utilização de técnicas criocirúrgicas para o tratamento dessas patologias, faltam subsídios na literatura que indiquem protocolos específicos e padronizados,

principalmente quanto ao número de ciclos de congelamento, tempo de aplicação e período de degelo.

Mendonça et al. (2011) relataram um caso clínico de um paciente do gênero masculino, de 39 anos de idade, que foi acometido por um ameloblastoma em maxila esquerda com invasão do seio maxilar. O tratamento instituído foi a hemimaxilectomia esquerda associada à crioterapia com gás refrigerante tetrafluoretano em *spray*, com intuito de preservar a fibromucosa palatina e diminuir a recidiva e/ou as sequelas da remoção cirúrgica do tumor. A crioterapia foi realizada com gás refrigerante (tetrafluoretano) à -50°C , por meio de três aplicações de 10 segundos cada, com intervalo de cinco minutos para reaquecimento dos tecidos. A fibromucosa palatina pôde ser preservada. Esta cicatrizou bem e sem a presença de fístulas ou fibrose excessiva. A mucosa apresentou-se íntegra e normocorada no acompanhamento de 18 meses de pós-operatório. No período de acompanhamento, o paciente encontrava-se bem e satisfeito com o resultado estético-funcional. A tomografia computadorizada de controle demonstrou não haver indícios de recidiva da lesão.

Para Bansal et al. (2012), a mucosa oral apresenta temperatura, umidade e consistência ideais para o uso da técnica da crioterapia. Os autores descreveram diversos protocolos de criocirurgia com nitrogênio líquido, baseado no tipo de lesão oral. As leucoplasias respondem bem a 2 ciclos de congelamento de 45-60 segundos e descongelamento também de 45-60 segundos. Os hemangiomas cavernosos grandes e os carcinomas de células basais respondem bem a 2 ciclos de um minuto e meio e o mesmo tempo de descongelamento. Tecidos neoplásicos invasivos requerem 3 ciclos de congelamento de 2,5 minutos e descongelamento de 3 minutos. Os autores concluíram que a criocirurgia é uma técnica muito segura, de fácil execução e relativamente barata para o tratamento ambulatorial de várias lesões orais benignas e malignas.

Kumar et al. (2012) relataram o uso da criocirurgia, pela técnica de *spray*, para o tratamento das pigmentações melânicas da gengiva. Os autores relataram o uso do gás refrigerante tetrafluoretano como alternativa ao uso do nitrogênio líquido. Recomendaram que a distância da ponta do *spray* ao tecido gengival fosse de aproximadamente 1 cm. Descreveram também o processo de congelamento no tecido gengival. Uma bola sólida de gelo é formada no congelamento. O descongelamento ocorre de 15 a 20 s. Este começa da periferia para o centro da bola de gelo. Com 12 horas, um fluido branco cheio de bolhas elevadas aparece. As bolhas aumentam após

24 horas. O teto da bolha é formado por uma membrana branca, delimitada por um halo avermelhado. Em 48 horas, a cápsula é rompida, expondo uma superfície lisa subjacente. Concluíram que a melhor técnica para tratamento das pigmentações foi a criocirurgia, pois esta apresenta resultados mais duradouros e menor índice de complicações.

Ribeiro et al. (2012) apresentaram uma série de casos de leucoplasias gengivais tratadas com *spray* de nitrogênio líquido. Foi realizada uma biópsia incisiva para confirmar o diagnóstico. Foram utilizados dois ciclos de congelamento de 10 segundos, com intervalo de 30-60 segundos para descongelamento espontâneo. Lesões maiores que 10 mm receberam duas ou mais sessões de tratamento, realizadas após um mês da última sessão. Utilizou-se anestesia local no procedimento. Os autores não relataram complicações com sangramento, perda de tecido, formação de cicatrizes, ou infecção. Além disso, a dor não foi percebida pelos pacientes. Três pacientes apresentaram edema discreto dentro de 24 horas após o tratamento. Recidivas não foram observadas. Concluíram que quando a leucoplasia envolver a gengiva, o tratamento de escolha deveria ser a crioterapia, e que esta técnica poderia ser utilizada no tratamento de outras alterações gengivais.

Singh et al. (2012) compararam os resultados da despigmentação gengival utilizando a crioterapia com *spray* de tetrafluoreto e o laser de diodo. Dez pacientes em cada grupo foram acompanhados por 3, 6, 12 e 18 meses. Foi realizada apenas anestesia tópica para minimizar o desconforto do congelamento. Cada área foi congelada continuamente por 30 a 40 segundos. Após 30 minutos o tecido tratado ficou vermelho e com 1 dia a necrose foi evidente. Não ocorreu sangramento, e uma dor leve foi relatada por todos os pacientes. Dois pacientes apresentaram manchas de melanina e receberam nova aplicação do criógeno. Em apenas 1 paciente as manchas permaneceram. Todos os pacientes ficaram satisfeitos com os resultados estéticos. Concluíram que, no período avaliado, as duas técnicas de despigmentação gengival foram equivalentes e satisfatórias.

Zimmerman e Crawford (2012) relataram protocolos para diversos tipos de lesões de pele e mucosas. Para lesões benignas como: acne, um ciclo de 5-15 s, uma vez; angioma, um ciclo de 10 s, uma vez; corno cutâneo, um ciclo de 10-15 s, uma vez; dermatofibroma, um a dois ciclos de 20-60 s, duas vezes (bimestral); cicatriz hipertrófica, um ciclo de 20 s, uma vez; unha encravada, um ciclo de 30 s, duas vezes (bimestral); quelóide, de um a três ciclos de 30 s, três vezes (bimestral); cisto mixóide,

um ciclo de 20 s, uma vez; molusco contagioso, um ciclo de 5-10 s, duas vezes (mensal); mucocele oral, um ciclo de 10 s, uma vez; granuloma piogênico, um ciclo de 15 s, uma vez; hiperplasia sebácea, um ciclo de 10-15 s, regime variável; ceratose seborreica, um a dois ciclos de 10-15 s, uma vez; marcas na pele, um ciclo de 5 s, uma vez; lentigo solar, um ciclo de 5 s, uma vez; e verruga vulgar, um a dois ciclos de 10-60 s, três vezes (mensal). Para as lesões pré-malignas como: ceratose actínica, um ciclo de 5-20 s, usualmente uma vez; doença de Bowen, um a dois ciclos de 15-30 s, três vezes (mensal); ceratoacantoma, dois ciclos de 30 s, usualmente uma vez; e lentigo maligno, duas vezes de 60 s, usualmente uma vez. Para lesões malignas como: carcinoma basocelular, dois a três ciclos de 60-90 s, usualmente uma vez; sarcoma de Kaposi, um a dois ciclos de 20-40 s, três vezes (mensal); e carcinoma de células escamosas, dois a três ciclos de 60-90 s, usualmente uma vez. Os autores citaram como vantagens da criocirurgia a facilidade de uso, os bons resultados cosméticos, sendo uma técnica segura, eficaz, de baixo custo e que não necessita de anestesia local.

Vyasarayani et al. 2014 relataram o uso da crioterapia para tratamento da epúlida fissurada associada à prótese total superior mal adaptada. O paciente, 71 anos, apresentava-se hipertenso, diabético e fazendo uso de medicação anticoagulante e com história prévia de infarto do miocárdio. A criocirurgia foi realizada com nitrogênio líquido, com aplicação de dois ciclos de 1 minuto e intervalos de 5 minutos de reaquecimento espontâneo. Segundo os autores, a técnica apresentada foi eficaz, não causou sangramento e apresentou boa cicatrização pós-operatória. Concluíram que a criocirurgia com nitrogênio líquido poderia ser utilizada com segurança em pacientes geriátricos debilitados e que a técnica tem como vantagem excelente hemostasia, boa cicatrização, ausência de infecção e mínimo edema e dor no pós-operatório. Além disso, os autores afirmaram que a criocirurgia pode ser utilizada no tratamento de outras patologias dos tecidos moles da boca, pois apresenta múltiplas vantagens.

2.7 Alterações histológicas

Existem poucas publicações sobre as alterações histológicas nos tecidos bucais após o uso da criocirurgia.

Hurt et al. (1972), após aplicação de nitrogênio líquido em hiperplasia gengival crônica, relataram a formação de bolha subepitelial e hiperemia no tecido conjuntivo, no pós-operatório imediato. Após três a quatro dias houve intenso infiltrado inflamatório.

Buch et al. (1979) estudaram, histologicamente, as alterações provocadas pelo congelamento e observaram que logo após a aplicação do agente criogênico havia a formação de uma vesícula subepitelial, sem a formação de hemorragias. As arteríolas e vênulas apresentavam trombose com degeneração da musculatura de suas paredes. Após seis horas da realização do procedimento, observou-se dano epitelial. Em 24 horas, verificou-se o aparecimento abundante de leucócitos e neutrófilos. No quarto dia de pós-operatório a necrose havia se estendido e a destruição dos vasos sanguíneos era evidente. Ao sexto dia a revascularização estava completa, completando a cicatrização com 14 dias.

Whittaker (1980) estudou as primeiras alterações celulares, após a criocirurgia, em mucosa de ratos, dando ênfase às células do epitélio basal e às células gigantes. Verificou, nos primeiros 30 a 40 minutos, um aumento da atividade mitótica nas células do epitélio basal, sugerindo que a criocirurgia estimularia a divisão celular.

Em 1984, Whittaker estudou as alterações celulares que ocorrem a -70°C , após aplicação de nitrogênio líquido, por 1 minuto, em língua de ratos. Os animais foram mortos após o procedimento e em diferentes tempos pós-operatórios. Progressivas alterações nos constituintes citoplasmáticos, na estrutura da parede da membrana celular, na lâmina densa e no núcleo foram aparentes após o reaquecimento celular. Houve dilatação de algumas seções do retículo endoplasmático, mas a distribuição dos ribossomos, a estrutura dos tonofilamentos e desmossomos e a espessura dos espaços intercelulares aparentavam-se normais. Dois minutos após o congelamento, foram vistas pequenas vesículas intracitoplasmáticas, intercaladas por uma membrana dupla. Largos vacúolos estavam presentes e se apresentavam em continuidade com o espaço extracelular, o que causava compressão nuclear. Os espaços intercelulares das células basais apresentavam uma estrutura granular,

intercalada com a membrana que estava ligada ao citoplasma da célula. Os desmossomos estavam intactos, os tonofilamentos apresentavam estruturas normais, porém menos densas. Havia marcada distorção do núcleo. Com 30 minutos, observou-se dano mitocondrial. A densidade citoplasmática estava reduzida e os tonofilamentos arranjados de maneira esparsa. Após 2 horas, bolhas estavam presentes. Com 5 horas, foi observada necrose tecidual. O fluxo sanguíneo retornou logo após o reaquecimento celular. Uma hora após o reaquecimento ocorreu a dilatação vascular. A formação de trombos com conseguinte estase do fluxo sanguíneo só aconteceu 5 horas após o procedimento. O autor concluiu que os danos vasculares ocorrem depois dos danos celulares.

TAL (1982) e TAL et al. (1982) estudaram histologicamente a cicatrização após os efeitos da criocirurgia, em extensa lesão leucoplásica, em mucosa bucal, e observaram que o epitélio que era inicialmente ortoceratinizado, com displasia média e quase não apresentava glicogênio, tornou-se paraceratinizado ou não ceratinizado, não displásico e com distribuição normal de glicogênio.

Schmelzeisen et al. (1989) avaliaram os efeitos da criocirurgia e do laser de Nd-YAG na mucosa bucal de coelhos. Os animais foram sacrificados após 1 hora, 1 dia, 3 dias e em 1, 3, 4, e 8 semanas de pós-operatório para análise histológica das lesões. Após 1 hora, a criolesão mostrou maior edema e necrose hemorrágica. Em 1 dia, a necrose criocirúrgica foi maior que a superfície da sonda, atingindo superficialmente a camada muscular e reação inflamatória aguda. Aos 3 dias, havia um extenso infiltrado inflamatório e a criolesão atingiu seu diâmetro máximo. Em 8 dias não havia mais edema em ambas lesões e pelo frio mostrava uma cicatrização mais lenta, com uma maior proliferação fibroblástica. Com 3 semanas, a criolesão apresentava-se bastante diminuída e, com 4 semanas, todas as lesões estavam cicatrizadas.

Pogrel et al. (1996) avaliaram histologicamente e com termografia infravermelha lesão provocada por nitrogênio líquido em abdômen de ratos após três ciclos de congelamento de 1 minuto e um tempo de descongelamento de 2.5 minutos. Oito animais receberam criocirurgia e foram sacrificados com uma semana após a crioterapia. Os autores concluíram que a área de isotérmica -20°C , que corresponde à zona de morte celular, ocupou 70% da área formada pela bola de gelo produzida. Este estudo mostrou que se pode estimar, clinicamente, que 70% da área interna da bola de gelo, em tecidos moles, finalmente sofrerá necrose. Histologicamente,

comprovou-se que a área isotérmica de -20°C corresponde à de necrose tecidual. Observaram que a profundidade de necrose formada é semicircular e tem 50% do diâmetro da bola de gelo inicial. Entretanto, a técnica seria cara para uso clínico e não poderia ser facilmente usada na cavidade oral.

Kumar et al. (2013) avaliaram histologicamente os efeitos do criógeno tetrafluoretano na despigmentação gengival. Doze pacientes com pigmentação melânica antiestética na gengiva foram incluídos no estudo. Oito pacientes com indicação de gengivoplastia ou gengivectomia para aumento de coroa foram expostos ao criógeno. As gengivectomias foram realizadas após 8, 24, 96 horas e após uma semana de aplicação do tetrafluoroetano. Quatro pacientes de pele clara que se queixavam de hiperpigmentação gengival antiestética sofreram despigmentação gengival usando o criógeno pesquisado. Após 96 horas da aplicação houve perda total das projeções epiteliais e o desprendimento da derme foi evidente. Uma completa reepitelização foi observada após uma semana. Concluiu-se que histologicamente tetrafluoroetano pode efetivamente destruir o epitélio gengival sem causar danos ao tecido conjuntivo, e este criógeno pode ser usado com segurança para despigmentação gengival.

Valente (2014) avaliou histologicamente a cicatrização de lesões cutâneas provocadas pelo *spray* de nitrogênio líquido em 40 ratos Wistar, associada ou não com terapia tópica. Macroscopicamente, a cada dois dias, analisaram-se as medidas das lesões e calculou-se a área e a taxa de contração cicatricial das mesmas. No 28º dia pós-operatório, procedeu-se à coleta das biópsias para avaliação histopatológica e imuno-histoquímica, quanto à presença de células inflamatórias, intensidade de deposição de colágeno, densidade de mastócitos, proliferação epitelial e angiogênese. Com base nos resultados obtidos, concluiu-se que não se observa diferenças estatísticas significativas entre os grupos pesquisados quanto à proliferação epitelial, neovascularização e deposição de colágeno, nas avaliações histopatológicas e imuno-histoquímicas aos 28 dias de pós-operatório. O autor sugeriu a realização de novos estudos com cicatrização de lesões causadas pela criocirurgia, no que diz respeito às ferramentas que podem ser usadas com o intuito de acelerar esse processo e melhorar a qualidade das cicatrizes. Propôs ainda, a realização de biópsias e análises histopatológicas em períodos de tempo menores que 28 dias, com a finalidade de detectar e compreender diferenças em todas as fases do processo de

reparo de feridas causadas pelo nitrogênio líquido (queimaduras frias), desde a promoção da crionecrose até sua queda e formação da cicatriz.

2.8 Vantagens

A criocirurgia é uma técnica muito segura, de fácil execução, eficaz, conservadora e relativamente barata para o tratamento ambulatorial de várias lesões benignas da cavidade bucal (POGREL, 1993; SANTOS; SANT'ANA-FILHO, 2002; BANSAL et al., 2012).

A segurança da técnica também está relacionada ao fato do gelo funcionar como um isolante térmico, evitando um espalhamento dos efeitos nocivos da criocirurgia (POGREL et al., 1996).

Em comparação a outras técnicas de tratamento, a criocirurgia tem como vantagens sua fácil aplicação, diminuição ou ausência de sangramentos no trans e pós-operatórios, ser um método relativamente indolor, não necessitando de anestesia, e poder ser realizada em pacientes de risco ou com patologias sistêmicas que dificultariam o procedimento cirúrgico (EMMINGS et al., 1967; SAKO et al., 1972; LEOPARD, 1975; POSWILLO, 1978; ISHIDA; RAMOS-E-SILVA, 1998; ZIMMERMAN; CRAWFORD, 2012).

Baseando-se em evidências clínicas, Whittaker (1984) relatou que o provável motivo de o paciente não sentir dor no pós-operatório está ligado à perda transitória da capacidade de transmitir o impulso nervoso.

Uma grande vantagem da técnica de crioterapia é a possibilidade de se tratar diversos tipos lesões que acometem a região maxilofacial. Dentre estas, destacam-se as leucoplasias, hiperplasias, granulomas, mucocelos, rânulas, hemangiomas, fibromas, líquen plano, queilite actínica, verruga vulgar, papilomas, estomatite nicotínica, ceroacantomas, lesões por HPV, doenças periodontais, ameloblastomas e ceratocistos. (EMMINGS et al., 1967; LEOPARD, 1975; POSWILLO, 1986; POGREL, 1993; THAI; SINCLAIR, 1999; SCHIMDT; POGREL, 2001; COSTA et al., 2010; MENDONÇA et al., 2011; BANSAL et al., 2012; VYASARAYANI et al., 2014).

A criocirurgia oferece grande vantagem em relação à excisão convencional, no tratamento de tumores benignos e lesões pré-cancerizáveis apresentando um menor

sangramento no transoperatório, menor dor pós-operatória e menor risco de infecção (GETTER; PEREZ, 1972; HURT et al., 1972; MARCUSHAMER et al., 1997; YEH, 2000; SHIRANI 2008, BUBLITZ et al., 2010; RIBEIRO *et al.*, 2012; SINGH et al., 2012; VYASARAYANI et al., 2014). Além disso, esta técnica não necessita de sutura (YEH, 2000; SHIRANI 2008).

A crioterapia pode ser empregada no tratamento de pigmentações que comprometam a estética do sorriso, apresentando resultados promissores (TAL et al., 1987; KUMAR et al., 2012; SINGH et al., 2012; KUMAR et al., 2013) e sem necessidade de curativos periodontais (KUMAR et al., 2012).

Tal (1992) afirma que o congelamento tecidual provocado pela crioterapia estimula a formação de trombos no tecido que circunda a lesão tratada, o que é favorável para o tratamento de lesões vasculares, pois permite um controle eficaz do sangramento.

Em tratamento de lesões vasculares, como os hemangiomas, a ausência de sangramento é decididamente uma vantagem (EMMINGS et al., 1967; LEOPARD; POSWILLO, 1974; HAUSAMEN, 1975; JARZAB, 1975; GONGLOFF; GAGE, 1983; TAL, 1992; LEMOS-JÚNIOR, 1999; YEH, 2000; BASAL *et al.*, 2012).

A simplicidade desta técnica a torna uma boa opção no tratamento de extensas hiperplasias papilares (EMMINGS et al., 1967; TURJANSKY; STOLAR, 1992; ISHIDA; RAMOS-E-SILVA, 1998) ou leucoplasias (EMMINGS et al., 1967; PRASAD et al., 2009; RIBEIRO *et al.*, 2012).

Algumas características da mucosa oral, tais como acessibilidade, umidade e consistência macia, favorecem muito a técnica de crioterapia, pois permitem um maior contato das sondas com o tecido (LEOPARD, 1975; TAL et al., 1982). Após o congelamento de mucosas doentes, a cicatrização ocorre sem complicações e resulta na regeneração tecidual (GONGLOFF; GAGE, 1983; TAL, 1992).

Experimentos em animais de laboratório têm confirmado impressões clínicas de que a cicatrização após a criocirurgia dá-se por regeneração, no qual a quantidade de colágeno encontrado nas cicatrizes é apreciavelmente menor do que nas produzidas por bisturi frio ou elétrico (TAL et al., 1982; BUCH et al., 1979; HURT et al., 1972).

Os resultados cosméticos após a aplicação da criocirurgia são excelentes (SANTOS; SANT'ANA-FILHO, 2002; ZIMMERMAN; CRAWFORD, 2012). O tratamento pode ser repetido quantas vezes forem necessárias sem formar cicatrizes

fibrosas, o que é importante em área cosmética da face e em sulcos anatômicos (SANTOS; SANT'ANA-FILHO, 2002). A regeneração tecidual, sem a formação de cicatriz, oferece uma grande vantagem quando comparada a excisão cirúrgica (TAL, 1992; YEH, 2000; BUBLITZ et al., 2010).

A introdução da técnica da criocirurgia no tratamento das patologias orais possibilitou ao cirurgião tratar lesões extensas de forma conservadora, sem a necessidade de reconstruções com enxertos e sem deixar cicatrizes retráteis (POGREL, 1993; POGREL et al., 1996; SCORTEGAGNA; SANT'ANA-FILHO, 2004; MENDONÇA et al., 2011).

Em tumores mistos intraósseos, com alto grau de recidiva, onde a ressecção com margem de segurança é indicada, a criocirurgia tem sido uma boa opção, pois o efeito letal do congelamento penetra no periósteo e osso adjacente, sede de prováveis células tumorais, produzindo a desvitalização e impedindo a recidiva e, desta forma, a ressecção óssea extensa pode ser evitada (EMMINGS et al., 1967; POGREL, 1993; POGREL et al., 1996; SCORTEGAGNA; SANT'ANA-FILHO, 2004; MENDONÇA et al., 2011).

A estrutura de nervos, vasos sanguíneos mais calibrosos, cartilagens e osso é em grande parte preservada após a desvitalização pela crioterapia, e serve como um arcabouço para o reparo desses tecidos (BARNARD, 1980; WHITTAKER, 1984; SCHMIDT; POGREL, 2004; GAGE et al., 2009).

Um estudo, que avaliou as alterações neurossensoriais após a crioterapia com nitrogênio líquido no tratamento de lesões mandibulares em estreita proximidade com o nervo alveolar inferior, concluiu que a crioterapia produz mínima alteração da função do nervo alveolar inferior (SCHMIDT; POGREL, 2004).

A isquemia local é a provável causa da lesão aos nervos. Notou-se que o perineuro e o epineuro sobrevivem ao congelamento, embora exibindo uma intensa reação inflamatória, e que ambos serviram de canal para os axônios em regeneração (GAGE et al., 2009).

2.9 Desvantagens

A criocirurgia não apresenta um efeito destrutivo padronizado, já que alguns tecidos apresentam maior resistência do que outros (LEOPARD, 1975). A dificuldade em julgar a extensão da lesão produzida pode resultar em destruição ineficaz de tecido patológico, pois a lesão pode ser maior que a capacidade de congelamento do instrumental, sendo necessária a realização de várias aplicações (READE, 1979).

Em cavidade bucal deve-se tomar cuidado para não se produzir um edema pós-operatório exagerado (LEOPARD, 1975). O edema, devido ao acúmulo de exsudato, é comum após a criocirurgia (SANTOS; SANT'ANA-FILHO, 2002). Procedimentos em língua ou em orofaringe podem produzir edemas severos e interferir na deglutição, mastigação e respiração do paciente (READE, 1979). O edema, principalmente em lesões em boca, é importante e só cede após uma semana (SANTOS; SANT'ANA-FILHO, 2002). Ainda segundo estes autores, ao atuar em lesões localizadas em base de língua, parede posterior de faringe ou amígdalas, o edema pode provocar uma obstrução das vias respiratórias, podendo necessitar de uma traqueostomia. Desta forma, estes pacientes devem ser tratados sempre em ambiente hospitalar (TURJANSKY, STOLAR, 1992; ISHIDA, RAMOS-E-SILVA, 1998).

As principais desvantagens do uso da crioterapia correspondem ao volume do edema e a extensão da área necrosada, pois não podem ser previstos (POGREL, 1993; POGREL et al., 1996).

A cicatriz normalmente não é fibrosa, porém a fibrose pode ocorrer em tratamento de lesões muito extensas (SANTOS; SANT'ANA-FILHO, 2002). Diante dessas lesões, muitas vezes o período de cicatrização é longo (MARCIANI, TRODAHL, 1975; READE, 1979). Apesar de a dor ser pouco frequente, devido à analgesia produzida pela criocirurgia, em lesões muito extensas ela pode estar presente (READE, 1979).

O congelamento inadvertido de grande quantidade de tecido mole que recobre osso pode causar exposição óssea e conseqüente formação de sequestro ósseo (MARCIANI; TRODAHL, 1975; POSWILLO, 1986; POGREL, 1993).

A anquilose de dentes que permaneceram na área congelada pode ocorrer (POSWILLO, 1986).

Durante a criocirurgia é necessário proteger as saídas dos ductos salivares das glândulas submandibulares e sublinguais, pois pode ocorrer uma sialadenite transitória (TURJANSKY, STOLAR, 1992; ISHIDA; RAMOS-E-SILVA, 1998).

Uma das maiores desvantagens da criocirurgia é a ausência de tecido para análise histológica (MARCIONI, TRODAHL, 1975; READE, 1979). Porém, uma biópsia incisional pode ser realizada antes da aplicação do agente crioterápico (LEOPARD, POSWILLO, 1974; LEOPARD, 1975; ISHIDA; RAMOS-E-SILVA 1998), ou por excisão de parte do tecido congelado que pode ser subsequentemente transportado congelado e tratado pelos métodos de biópsia por congelamento (LEOPARD, POSWILLO, 1974; LEOPARD, 1975). O tecido congelado e excisado pode ser imerso em solução fixadora, onde se descongelará completamente, sendo processado para análise histológica de forma convencional (POSWILLO, 1975; TAL, 1982).

Alguns pacientes não podem receber a criocirurgia. Geralmente as contraindicações são raras e podem ser divididas em absolutas, gerais e relativas (ISHIDA; RAMOS-E-SILVA, 1998; ISHIDA, 2013). Segundo os mesmos autores, as contraindicações absolutas são: urticária ao frio, intolerância ao frio, criofibrinogenemia, crioglobulinemia, doença de Raynaud, doenças autoimunes, pioderma gangrenoso, agamaglobulinemia e diabetes descompensado. As contraindicações gerais são: tumores sem margens bem definidas, lesões localizadas no ângulo da boca ou na borda do lábio, neoplasias localizadas em área de fusão dos tecidos embrionários, lesão na margem livre das pálpebras, carcinoma espinocelular infiltrante ou ulcerado, melanoma cutâneo, tumores anexiais, tumor de célula de Merkel e falta de habilidade do operador. As contraindicações relativas são: lesão sobre localização superficial de nervos (margem lateral dos dedos, fossa ulnar, região pré e pós-auricular e área lateral da língua), terço inferior da perna e parte inferior do ombro (devido à cicatrização prolongada) e paciente melanoderma (devido à alteração pigmentar).

Citam-se ainda como contraindicações à criocirurgia o suprimento vascular prejudicado, mieloma múltiplo e discrasia sanguínea. E que se deve ter cautela no uso da técnica nos pacientes que fazem uso de anticoagulantes, alérgicos, pessoas de pele escura, crianças, idosos, em pele danificada pelo sol ou irradiada e em locais de proeminência óssea (ZIMMERMAN; CRAWFORD, 2012)

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Realizar o estudo morfológico comparativo da crioterapia utilizando o nitrogênio líquido e o gás refrigerante propano-butano na mucosa bucal de ratos.

3.2 Objetivo específico

- Investigar os principais efeitos do uso local do gás refrigerante propano-butano sobre a mucosa bucal de ratos, comparando seus efeitos com os do nitrogênio líquido.

4 METODOLOGIA

Esta pesquisa foi realizada de acordo com os princípios éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e também foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (CEUA-UFMS), sob o protocolo 578/2013 (ANEXO A).

4.1 Desenho do estudo

Esta pesquisa enquadra-se na classificação dos estudos experimentais.

4.2 Animais experimentais

Para avaliação do efeito da crioterapia com os criógenos selecionados, utilizou-se 30 ratos albinos, da espécie *Rattus norvegicus*, ordem *Rodentia*, da linhagem Wistar, machos, adultos, hípidos, com quatro meses de idade, pesando entre 350-450 gramas, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS). Os animais foram alojados em gaiolas retangulares de polipropileno, cada uma acomodando cinco animais, dispostas em estante ventilada, com temperatura controlada (23°C), e ciclo claro-escuro de 12 horas (luzes acesas às 07:00 horas e apagadas às 19:00 horas), durante quinze dias, antes do início dos procedimentos, para aclimação e quarentena no Setor de Experimentação do Biotério Central da UFMS. Após o período de adaptação, os animais foram separados e mantidos em gaiolas individuais até o final do experimento (Figura 1).

A alimentação fornecida foi à base de ração comercial balanceada (Nuvilab® CR1-Nuvital Nutrientes Ltda., Colombo, Brasil) e água, fornecidas *ad libitum*. A limpeza das caixas foi realizada três vezes por semana, por pessoal treinado em

bioterismo. Os animais permaneceram no Biotério Central da UFMS durante todo período da pesquisa. Estes foram mantidos e manipulados segundo as normas COBEA e CEUA-UFMS.



Figura 1 – Local onde os animais ficaram durante a pesquisa.

4.3 Amostra

Os animais foram divididos por meio de sorteio randomizado em 5 grupos com 6 animais cada, de acordo com o período estipulado para eutanásia de 1, 3, 7, 14 e 21 dias. Cada grupo foi subdividido em grupo-teste, utilizando o Endo-Frost[®] na mucosa interna do lábio superior direito de cada animal do grupo, e grupo-controle, utilizando o nitrogênio líquido com o Nitrospray[®] do lado contralateral (Figura 2).

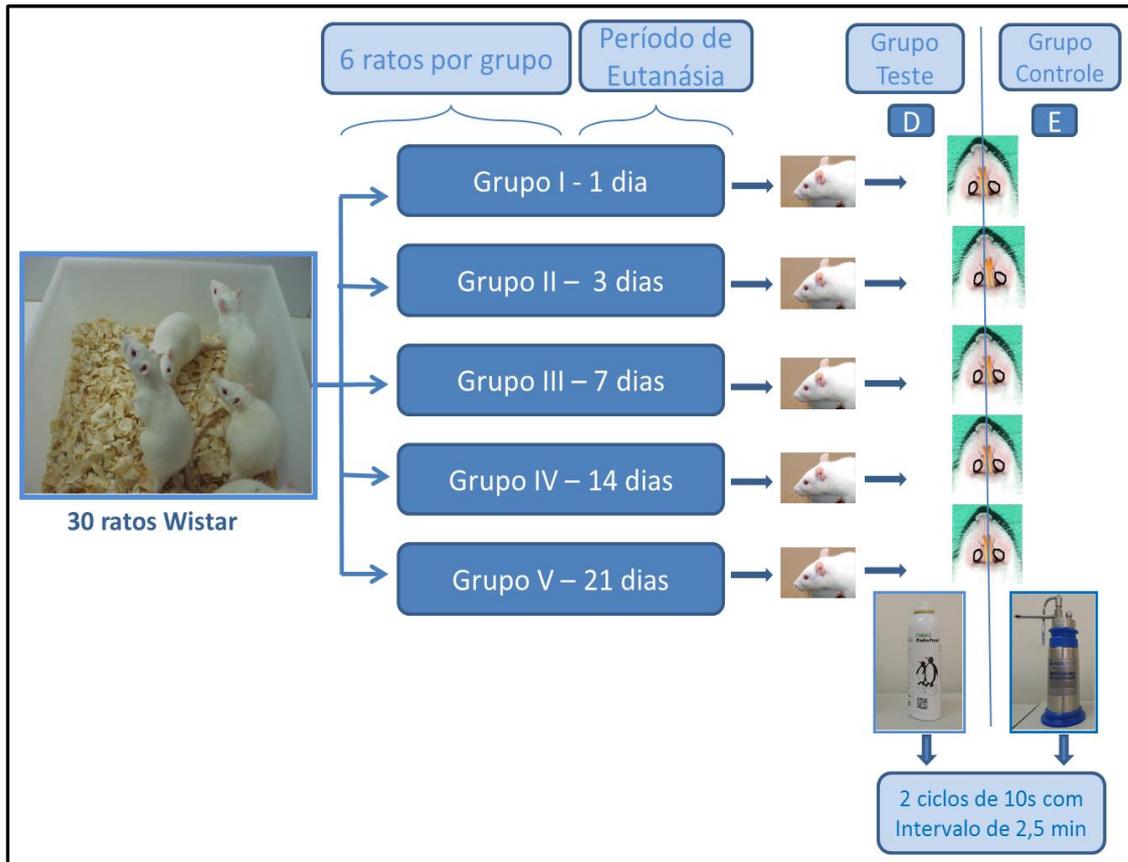


Figura 2 – Fluxograma da amostra.

4.4 Materiais

4.4.1 Aparelhagem

Utilizou-se um aparelho criocauterização ou Nitrospray[®] (fabricado pela Nitrospray[®] Indústria e Comércio Ltda., Brasil), de aço inoxidável, com altura de 265 mm e com capacidade de armazenar 350 ml de líquido refrigerante.

Este aparelho apresenta pontas abertas com furos centrais de 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9 e 1,0 mm de diâmetro que são para aplicações do tipo *spray* ou “open sprays”. O equipamento também acompanha diversas formas e tamanhos de pontas ou sondas fechadas, que são indicadas para aplicações por contato direto nos tecidos. Estas pontas também são conhecidas como probes ou “close probes” (APÊNDICE A).

Na pesquisa foi utilizada a ponteira aberta de 0,7 mm, pois esta quando afastada do tecido alvo de 5 a 10 mm, produz um *spray* de 5 a 6 mm de diâmetro, segundo as orientações de uso do próprio fabricante.

Ainda segundo o fabricante, o reservatório deve ser carregado com um terço ou metade do volume deste, aguardando alguns segundos para permitir a evaporação do nitrogênio. Depois de cessada a evaporação inicial, atinge-se o equilíbrio térmico e a tampa pode ser fechada, estando o aparelho pronto para uso. Este equipamento apresenta uma válvula de segurança na tampa que se abre esporadicamente e controla a pressão interna do reservatório. Isso permite que o aparelho não estoure, pois o nitrogênio líquido se encontra em constante ebulição.

4.4.2 Dispositivo protetor

Foi criado um dispositivo de acrílico rígido, de 2 mm de espessura, com 4 cm de altura, com 6 cm de diâmetro interno na região superior e 5 mm de diâmetro interno na região inferior, com objetivo de limitar o dano tecidual e padronizar as exposições aos criógenos (Figuras 3 e 4).



Figura 3 – Dispositivo protetor com abertura de 5 mm de diâmetro e 2 mm de espessura.

4.4.3 Agentes criogênicos

Foram utilizados dois tipos de agentes crioterápicos. Um foi o nitrogênio líquido medicinal, que foi obtido na empresa Nitrovalle Comércio de Nitrogênio Ltda., com sede em Campo Grande – MS. O produto foi armazenado em contêiner próprio, com capacidade para até 20 litros. O Nitrospray® foi carregado com nitrogênio líquido minutos antes do procedimento criocirúrgico.

O outro agente crioterápico testado foi *spray* Endo-Frost® (Roeko, Langenau, Alemanha) que contém uma cânula de plástico própria do sistema. Esta apresenta um comprimento de 10 cm e um diâmetro interno de 1,2 mm (APÊNDICE B). O produto encontra-se pronto para o uso.

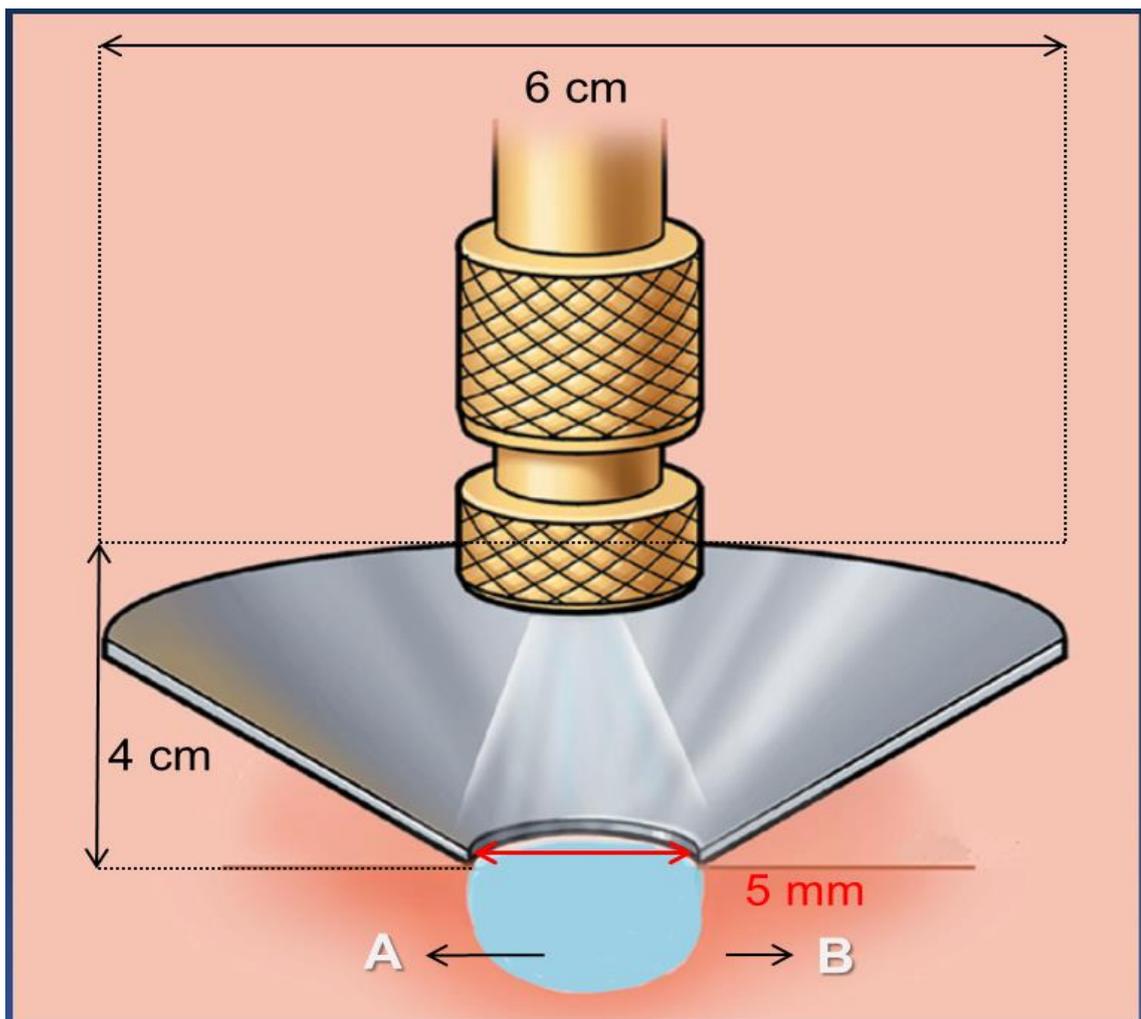


Figura 4 – Desenho esquemático das medidas do dispositivo protetor e sua adaptação nos tecidos (B) para formação da bola de gelo (A).

4.5 Técnica operatória

Os procedimentos criocirúrgicos, assim como as biópsias, foram realizados na sala de cirurgia experimental do Biotério Central da UFMS, empregando-se instrumental padronizado, e seguindo o protocolo padrão de biossegurança do setor.

Imediatamente antes da fase cirúrgica, os animais foram pesados com balança digital calibrada para cálculo da dosagem anestésica e controle de peso no pré-operatório. A técnica anestésica adotada foi a anestesia geral, por via intraperitoneal, com infiltração anestésica na região abdominal do lado direito (Figura 5). Foram utilizadas seringas de 1 ml, graduadas em 100 unidades, e agulhas descartáveis de insulina (0,45x13 mm). Foram escolhidas agulhas finas para minimizar o risco lesão aos órgãos internos e vasos calibrosos. O protocolo anestésico adotado foi a associação de 1 ml de cloridrato de cetamina 10% (Syntec[®], Cotia/SP, Brasil) e 1 ml de cloridrato de Xilanzina 2% (Syntec[®], Cotia/SP, Brasil), na dosagem de 0,1 ml/100g de peso corporal, resultando em num efeito anestésico de 40 minutos. Tomou-se o cuidado de se realizar aspiração negativa e de se posicionar o animal com o crânio voltado para o solo e com a cauda voltada para cima, formando um ângulo de 45° deste com o solo. Neste momento, realizou-se leve compressão digital no lado direito do abdômen, deslocando as vísceras em direção ao tórax, evitando assim perfurações viscerais e sepse.

Após a infiltração do anestésico, a sedação completa, com perda de tônus muscular, ocorreu dentro de 5-10 minutos. Os animais foram numerados na cauda (de 1 a 30), com caneta preta fina e de feltro (Faber-Castell[®], Brasil), de forma a poder identificá-los posteriormente. Estes permaneceram em um ambiente ventilado e aquecido durante todo o efeito anestésico para evitar a hipotermia.

A antissepsia da cavidade oral e dos lábios foi feita com hastes flexíveis de algodão embebidos com digluconato de clorexidina a 2% (FGM Produtos Odontológicos, Joinvile/SC, Brasil). A região a ser operada foi delimitada com caneta preta própria para a pele (Texta[®] 500 extra fine, Japão), de forma circular e com 5 mm de diâmetro, e tendo como limites anatômicos: lateralmente, a comissura labial; medialmente, o limite lateral do palato duro; e anteriormente, o lábio superior. O limite posterior encontrava-se a 5 mm do limite anterior e em direção à orofaringe (Figuras 6 e 7). O próprio dispositivo protetor foi utilizado com guia da marcação.

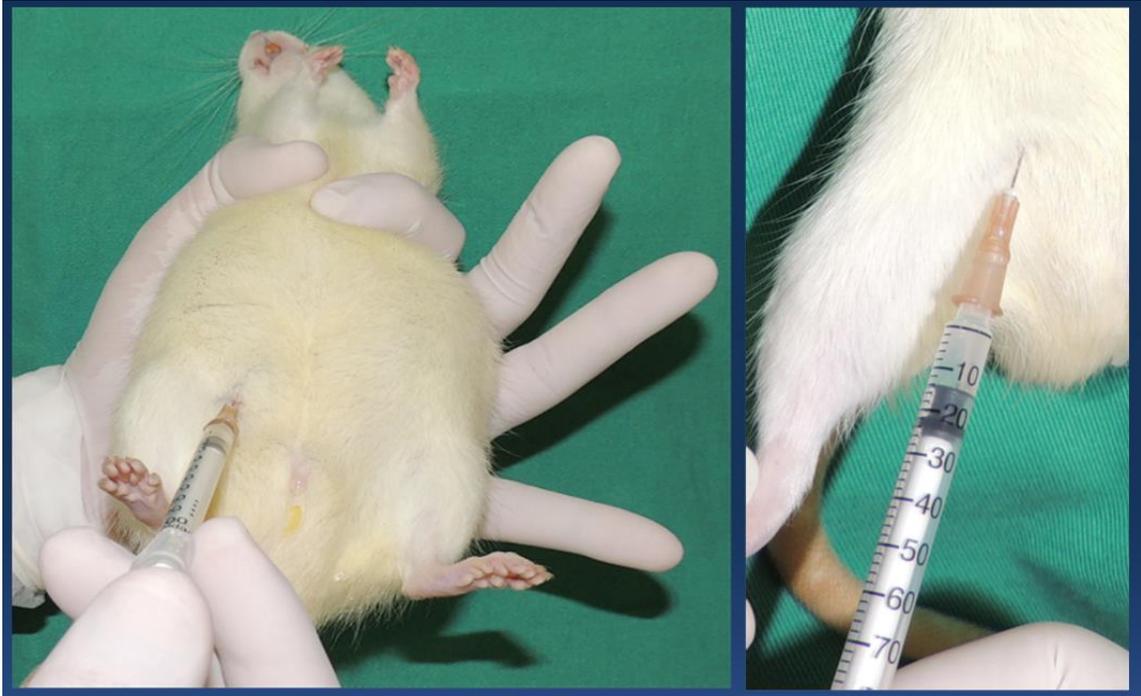


Figura 5 – Técnica de anestesia intraperitoneal.

Após as devidas marcações os animais foram posicionados em decúbito dorsal horizontal na mesa cirúrgica, fixando-os pelo rabo no campo cirúrgico com esparadrapos e inclinado a cabeça para trás em hiperextensão (Figura 8). Desta forma foi possível utilizar os aparelhos na posição vertical e em 90° com o solo, evitando interrupções na produção do *spray* e no processo de congelamento dos tecidos. Além disso, esta posição favoreceu o escoamento, para longe do corpo do animal, do líquido gelado produzido pelo Endo-Frost®, através do dispositivo protetor, durante todo o ciclo de congelamento (Figura 9).

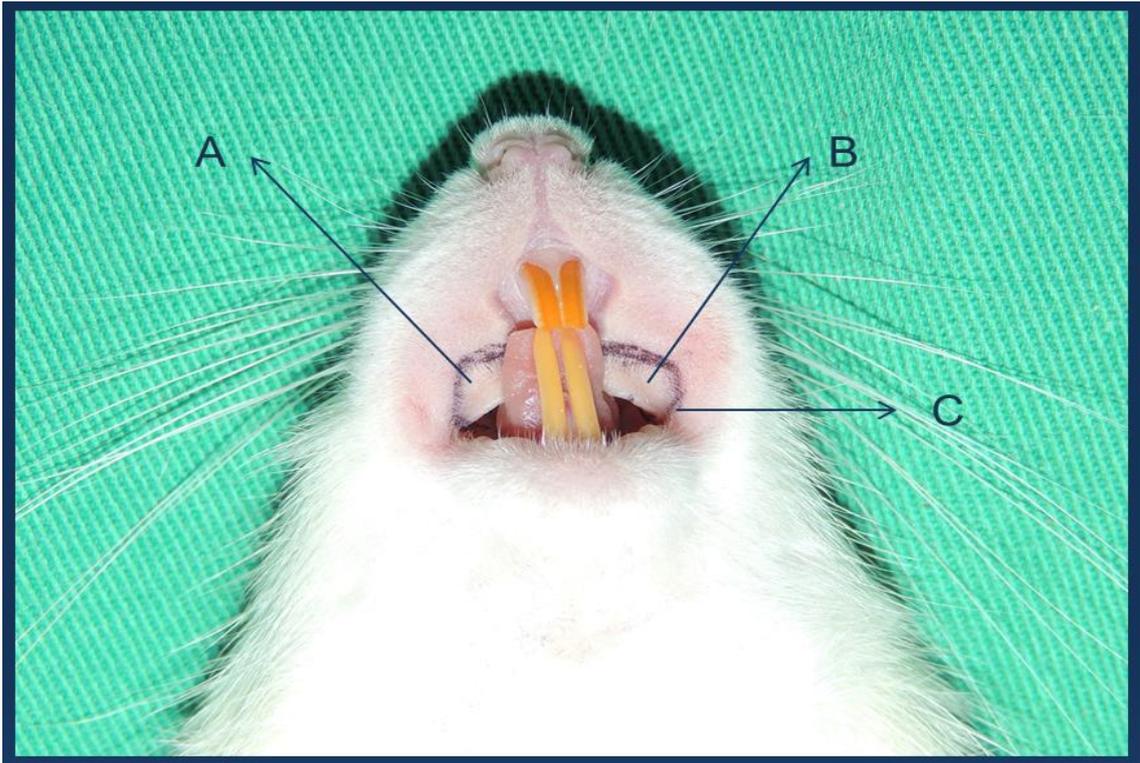


Figura 6 – Demarcação com caneta preta dos locais de aplicação do Endo-Frost® (A) e do nitrogênio líquido (B). O ponto de referência da comissura labial (C).

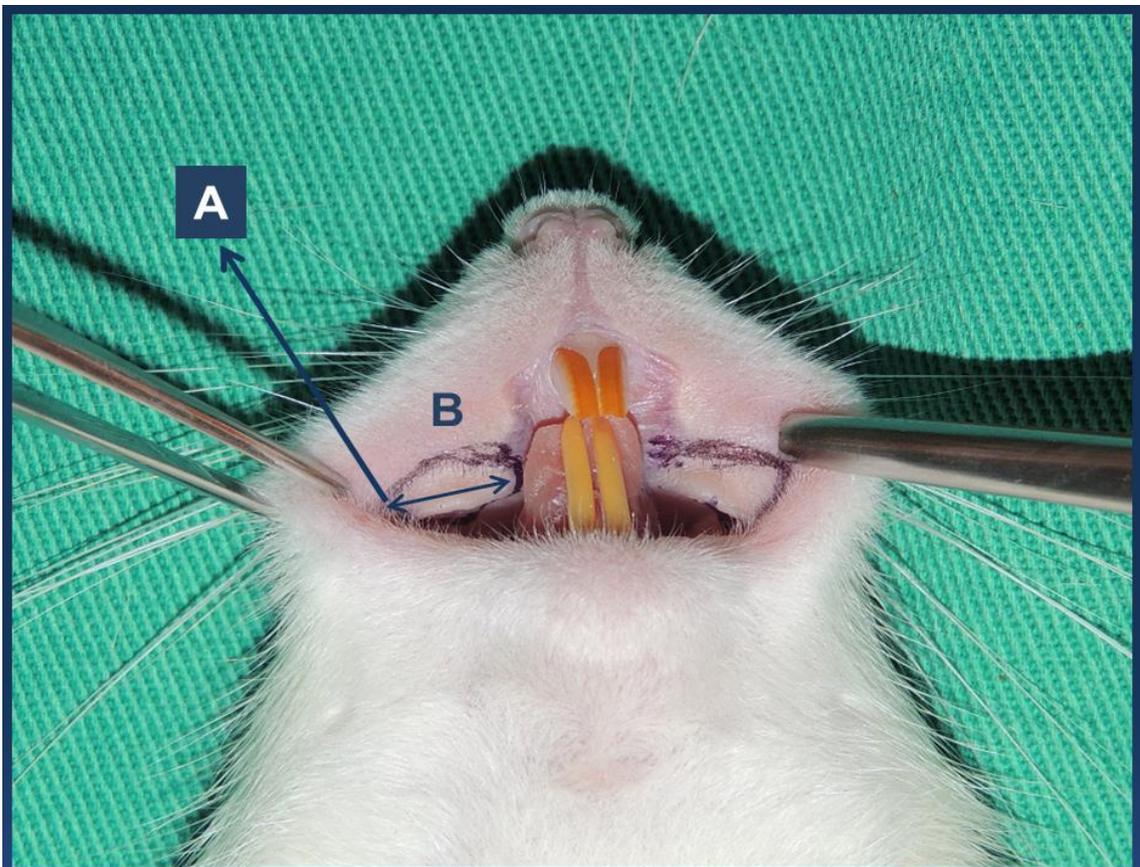


Figura 7 – Local de aplicação da crioterapia com 5 mm de diâmetro (seta menor). Limite lateral (A) e limite anterior (B).



Figura 8 – Demonstração do posicionamento correto do Nitrospray® e a utilização do dispositivo protetor. Notar o posicionamento do animal na mesa cirúrgica.



Figura 9 – Demonstração do posicionamento correto do Endo-Frost®.

A aplicação dos agentes crioterápicos foi realizada com o sistema aberto e na forma de *sprays*, com uma distância aproximada de 1 cm dos tecidos (Figura 10). Com os aparelhos em posição e com pressão máxima no botão ativador, no caso do Endo-Frost®, e pressão máxima no gatilho ativador Nitrospray®, adotou-se o seguinte protocolo: duas aplicações de 10 segundos, sem interrupções, para o congelamento dos tecidos; e intervalos de 2,5 minutos, para o aquecimento espontâneo dos tecidos (Figura 11). Os tempos foram marcados em cronômetro digital.

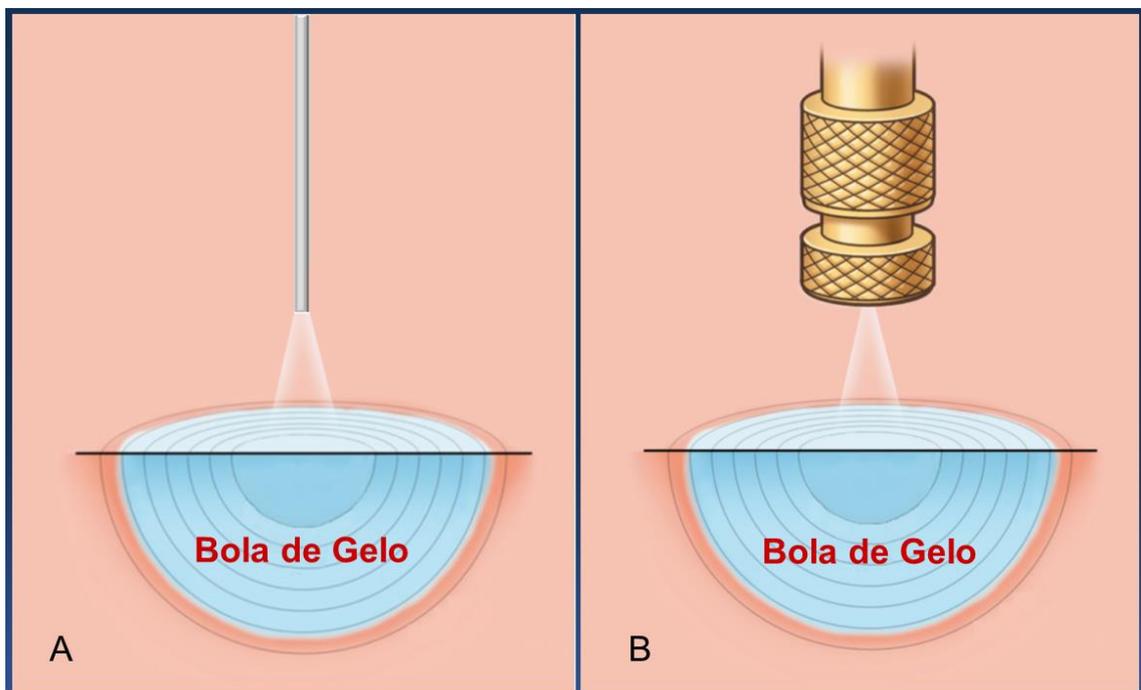


Figura 10 – Desenho esquemático demonstrando a técnica de congelamento com o Endo-Frost® (A) e com *spray* de nitrogênio, com formação da bola de gelo no interior dos tecidos.

Após o tratamento criocirúrgico os animais foram colocados em gaiolas individuais e acompanhados até que se recuperassem da anestesia. Neste momento registou-se as principais informações em cartões individuais que foram fixados nas gaiolas. Cada crachá continha: o número do grupo e do animal; o controle de pesos; as datas de nascimento e criocirurgia; os horários de início e fim da criocirurgia; e data e hora programadas para eutanásia e biópsia. Após a completa recuperação, os animais retornaram às suas acomodações em ambiente controlado (Figura 12). Estes foram observados diariamente com objetivo de documentar possíveis complicações.

No pós-operatório nenhum medicamento foi prescrito para controle da dor, uma vez que o procedimento oferece mínimo trauma. Nenhum anti-inflamatório ou antibiótico foi prescrito para não interferir nos resultados da pesquisa.

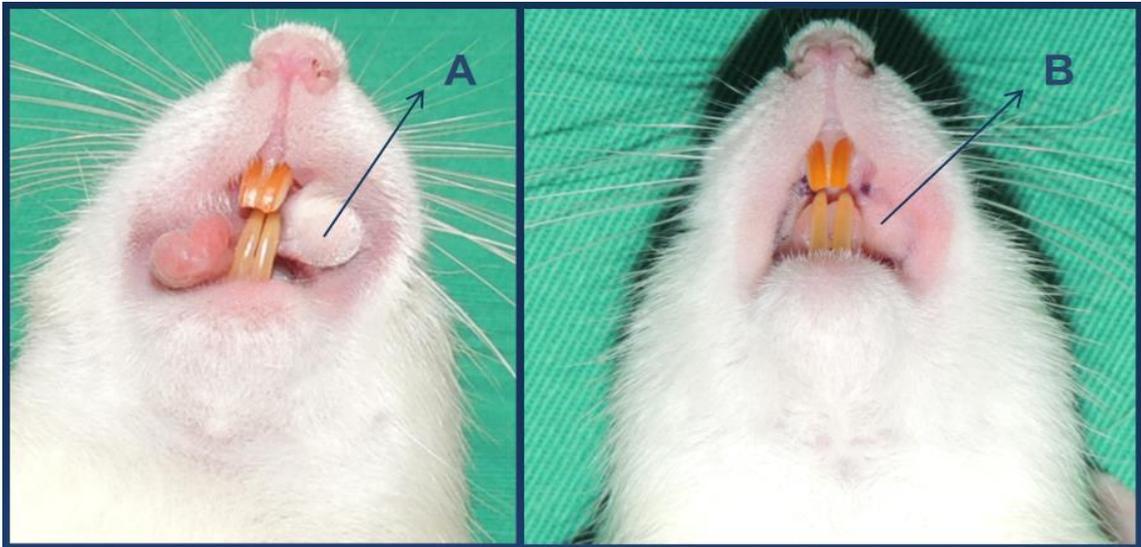


Figura 11 – Aspecto clínico da bola de gelo formada após o primeiro ciclo de congelamento de 10 segundos (A). Aspecto da mucosa após 2,5 minutos de aquecimento espontâneo (B).



Figura 12 – Condições das acomodações e identificação dos animais por crachás.

4.6 Biópsia e processamento das peças

Depois de transcorrido os períodos experimentais de 1, 3, 7, 14 e 21 dias, os animais foram submetidos ao mesmo protocolo anestésico descrito anteriormente. Para realização das biópsias, utilizou-se pinça dente de rato delicada de 14 cm e cabo de bisturi n°3 (Quinelato®, Rio Claro – SP, Brasil) com lâminas de bisturi n° 15C (Embramac®, Campinas, SP, Brasil), sendo estas foram utilizadas apenas uma vez.

Em seguida, procedeu-se à remoção da área total das feridas, incluindo 2 mm além da interface entre o tecido sadio e a cicatriz em toda sua extensão, tanto do lado direito quanto do esquerdo (Figura 13).

Os fragmentos foram identificados quanto ao animal e ao lado a que pertenciam, fixados em solução neutra de formaldeído a 10% e, posteriormente, incluídos em parafina e processados de forma rotineira. Em seguida, ainda sob efeito anestésico, os animais foram sacrificados em câmara de dióxido de carbono (CO₂) (Figura 14).

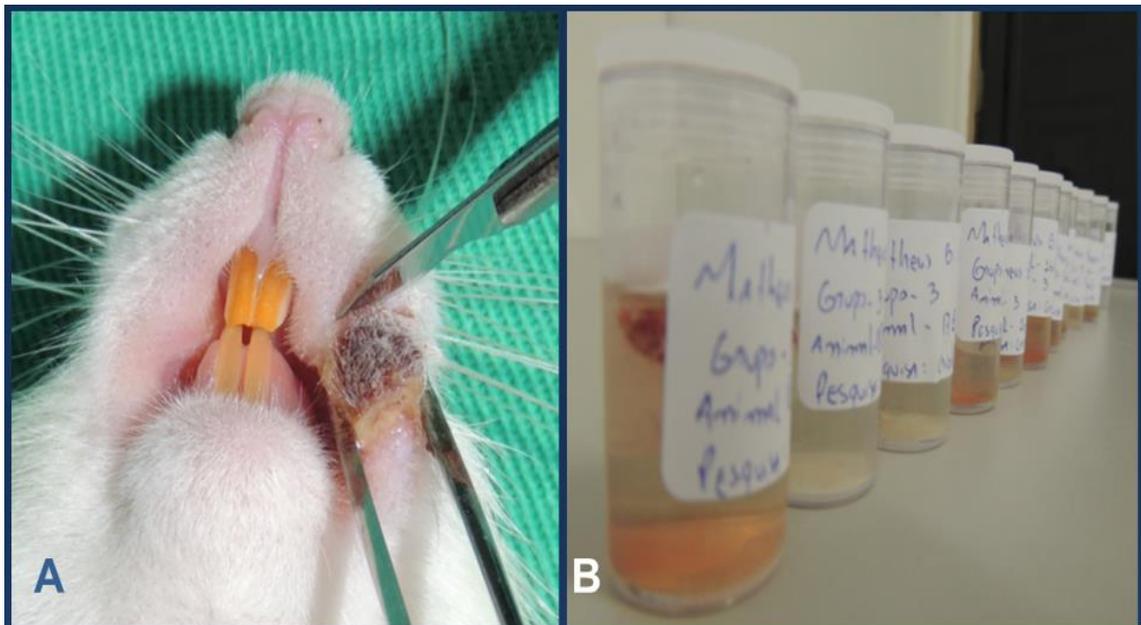


Figura 13 – Biópsia da criolesão (A) e armazenamento das peças em formol a 10%.



Figura 14 – Câmara de CO₂.

Os fragmentos foram submetidos à técnica histológica de rotina para inclusão em parafina. O material foi incluído de forma que toda profundidade da criolesão pudesse ser observada. Finalmente terminada a inclusão, os blocos sofreram cortes semisseriados de 5 μm de espessura no sentido longitudinal, obtidos a cada 1000 micrômetros, originando uma média de quatro lâminas por peça. Os cortes realizados foram corados através da técnica Hematoxilina-Eosina (HE) e as lâminas para microscopia óptica montadas em lamínula e Entellan® (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha).

4.7 Avaliação macroscópica

Os animais foram acompanhados nos períodos pós-operatórios de 1, 3, 7, 14 e 21 dias. Em cada visita de controle os animais foram anestesiados e os dados macroscópicos coletados foram registrados em uma ficha de parâmetros clínicos. Para facilitar o exame clínico e a análise comparativa dos eventos teciduais que

ocorreram em cada período, foram tiradas fotografias digitais de 16.1 megapixels de resolução (máquina Nikon® Coolpix P510, Japão). As fotografias foram analisadas pelo pesquisador para que este classificasse as alterações teciduais presentes em cada período e em todos os animais pesquisados.

As lesões foram classificadas quanto à presença ou ausência de: edema, hiperemia, necrose, crosta, equimose, limites indefinidos e cicatrização incompleta (Figura 15). Todos estes dados foram anotados no formulário de parâmetros clínicos (APÊNDICE C). Esta análise macroscópica foi desenvolvida por Beltrão (2003) e adaptada para este experimento.

4.8 Avaliação microscópica

As lâminas histológicas foram codificadas e examinadas por um profissional qualificado que desconhecia a qual grupo pertencia cada amostra em análise. Cada lado operado (grupo-teste o direito e grupo-controle o esquerdo) foi avaliado separadamente.

Para o exame histológico, utilizou-se microscópio de luz Primo Star® (Carl Zeiss, Gottingen, Alemanha) em um aumento de 40 a 400 vezes. As variáveis qualitativas observadas foram edema, bolha, coágulo, desestruturação epitelial, hemorragias, úlcera, necrose e epitélio alterado. Estas lesões foram classificadas como ausente ou presente. O epitélio foi classificado como anormal quando se apresentava com qualquer alteração na sua morfologia (Figura 16). Todos estes dados foram anotados no formulário de parâmetros histológicos para análise morfológica (APÊNDICE D). Esta análise microscópica foi desenvolvida por Santos e Sant'Ana-Filho (2002) e adaptada para este experimento.

A da reação inflamatória foi avaliada pela presença e densidade de células do infiltrado inflamatório (mononucleares e polimorfonucleares). Este infiltrado foi classificado de acordo com a quantidade de células inflamatórias contadas no campo microscópico onde a reação inflamatória era mais intensa. Foram contados linfócitos, plasmócitos, macrófagos e células gigantes multinucleadas. A resposta inflamatória foi avaliada quanto ao tipo, intensidade, extensão e estado geral da mucosa (Figura 17). Todos estes dados foram anotados no formulário de parâmetros histológicos para avaliação da resposta inflamatória (APÊNDICE E).

4.9 Análise dos resultados

Os dados foram agrupados de acordo com os parâmetros clínicos e histológicos para análise estatística. Os resultados obtidos com a análise morfológica e com a resposta inflamatória foram submetidos ao teste de ANOVA ou Análise de Variância.

Quadro 1 – ESCORES UTILIZADOS PARA ANÁLISE MACROSCÓPICA	
MORFOLOGIA	
Escores	
	Edema
0	
1	
	Hiperemia
0	
1	
	Necrose
0	
1	
	Crosta
0	
1	
	Equimose
0	
1	
	Limites indefinidos
0	
1	
	Cicatrização incompleta
0	
1	

Figura 15 – Quadro demonstrativo dos critérios utilizados para análise macroscópica com relação à morfologia. Escore 0, evento ausente, e escore 1, evento presente.

Quadro 2 – ESCORES UTILIZADOS PARA ANÁLISE MICROSCÓPICA	
MORFOLOGIA	
Escores	
	Edema
0	
1	
	Bolha
0	
1	
	Coágulo
0	
1	
	Desestruturação epitelial
0	
1	
	Hemorragias
0	
1	
	Úlcera
0	
1	
	Necrose
0	
1	
	Epitélio anormal
0	
1	

Figura 16 – Quadro demonstrativo dos critérios utilizados para análise microscópica com relação à morfologia. Escore 0, evento ausente, e escore 1, evento presente.

Quadro 3 – ESCORES UTILIZADOS PARA ANÁLISE MICROSCÓPICA

RESPOSTA INFLAMATÓRIA

Escores	Tipo
0	ausente
1	crônica
2	mista
3	aguda

Escores	Intensidade
0	ausente
1	leve (número médio inferior a 10 células)
2	moderada (número médio de 10 a 25 células)
3	severa (número médio superior a 25 células)

Escores	Extensão
0	ausente
1	leve (envolve até 20% da área examinada)
2	moderada (envolve de 21% a 50% da área examinada)
3	severa (envolve mais de 50% da área examinada)

Escores	Estado geral da mucosa
0	reação inflamatória ausente
1	reação inflamatória presente
2	abscesso
3	necrose

Figura 17 – Quadro demonstrativo dos critérios e escores utilizados para análise microscópica com relação à resposta inflamatória.

5 RESULTADO

Para análise estatística, realizou-se o teste de ANOVA ou Análise de Variância ($\alpha=0,05$). O valor de F foi calculado com relação à morfologia macroscópica ($F=0,66$) e microscópica ($F=0,87$) e com relação à resposta inflamatória ($F=0,24$).

Para a morfologia macroscópica e microscópica, ambas com 13 tratamentos, 56 graus de liberdade e com valor tabelado de 1,93, aceitou-se a hipótese nula (H_0), pois o valor de F calculado foi menor que o valor tabelado. O critério Coágulo não foi incluído nesta análise, pois não se observou esta alteração em nenhum momento da pesquisa. Logo, os dois tratamentos foram considerados estatisticamente iguais ou equivalentes.

Para resposta inflamatória, com 7 tratamentos, 32 graus de liberdade e valor tabelado de 1,93, também aceitou-se H_0 . Desta forma, o teste revelou não haver diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (experimental e controle) para todos os parâmetros avaliados. Concluiu-se também que os dois tratamentos utilizados foram iguais ou equivalentes.

5.1 Exame clínico dos animais

Com relação ao comportamento dos animais, notou-se que, já no primeiro dia de pós-operatório, os ratos se alimentavam, porém com alguma restrição devido à presença de edema bilateral no lábio superior. Entretanto, apesar de o número de casos serem equivalentes, o edema sempre foi mais acentuado nos animais tratados com o nitrogênio líquido (Figura 18). Desta mesma forma, a necrose, a formação de crosta, a hiperemia e a equimose foram sempre maiores, em proporção, no grupo tratado com nitrogênio líquido.

Quanto à dor, acredita-se que esta foi leve ou ausente, pois os animais se mantiveram ativos, dóceis e apresentando normofagia, normodipsia, normúria e normoquesia. Este mesmo critério foi utilizado por Valente (2014) para avaliar a dor após a criocirurgia no dorso de ratos Wistar. A análise da diferença de peso inicial e final (eutanásia) confirmou este achado. No período de observação de 1 e 3 dias os

animais apresentaram um perda de peso leve (média de 13 g), relacionados ao estresse da manipulação e ao trauma cirúrgico. No 7º dia a maioria dos animais recuperaram o peso perdido. Com 14 dias todos os animais ganharam peso. E finalmente com 21 dias, notou-se um incremento médio de 38 g de peso corporal.

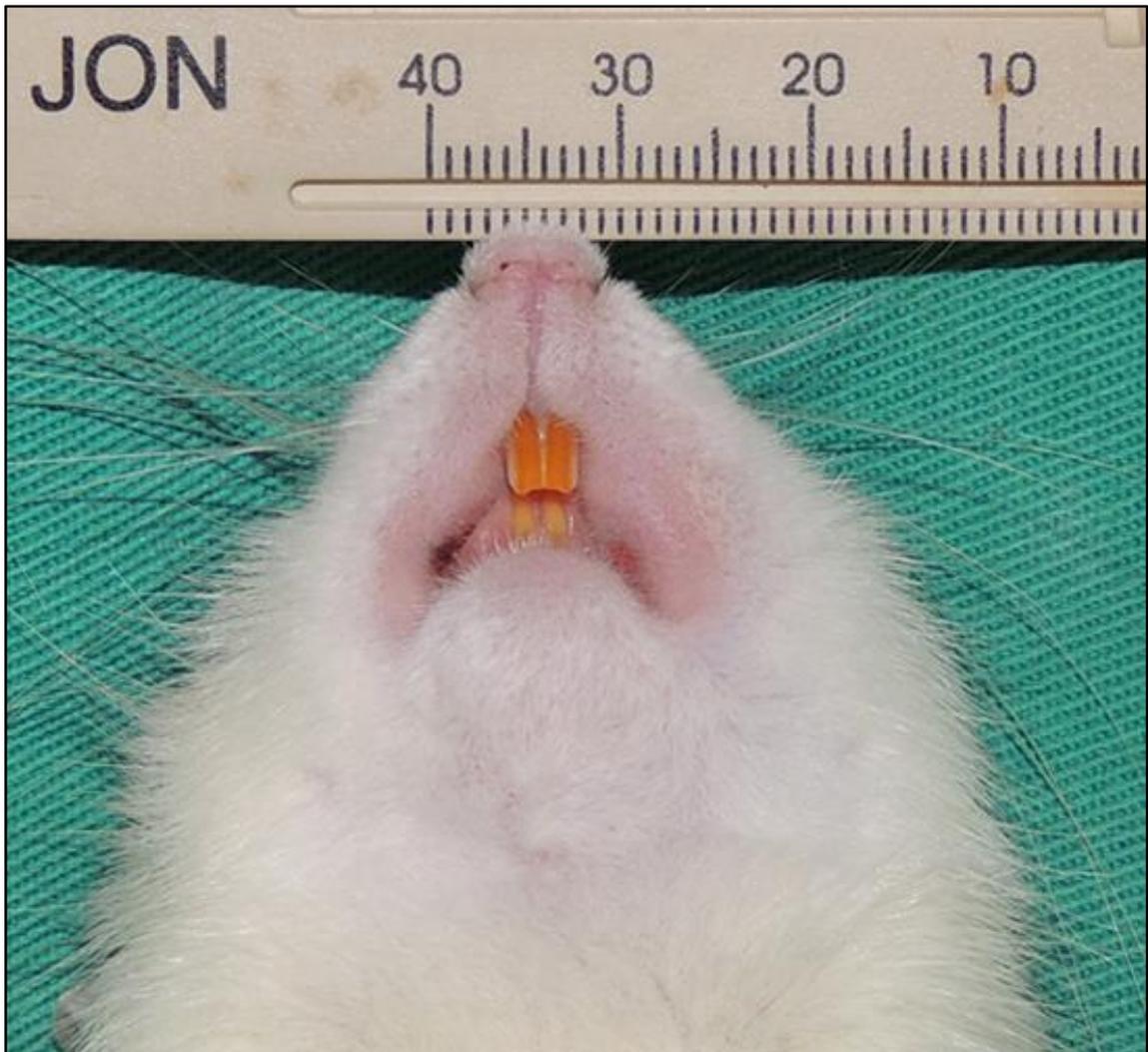


Figura 18 – Aspecto clínico da criolesão no 1º dia de pós-operatório. Notar o edema mais pronunciado no lado esquerdo, grupo este tratado com nitrogênio líquido.

Não houve hemorragia ou infecção visível ao exame clínico nos dois grupos. No período de observação de 21 dias, notou-se formação de uma pequena cicatriz, porém a cicatrização evoluiu sem formação de fibrose ou limitação da movimentação do lábio. A cicatriz formada provavelmente desapareceria se o período de

acompanhamento fosse um pouco maior, já que com 21 dias esta era pouco perceptível.

5.2 Análise macroscópica

Com auxílio de fotografias digitais, realizou-se a análise morfológica das alterações teciduais de acordo com os parâmetros clínicos determinado na metodologia (Figura 19).

Para facilitar a interpretação visual dos resultados, utilizou-se um gráfico resumindo os efeitos clínicos da crioterapia (Figura 20). Além disso, foram criados gráficos de cada critério morfológico para simplificar a análise (APÊNDICES F, G e H).

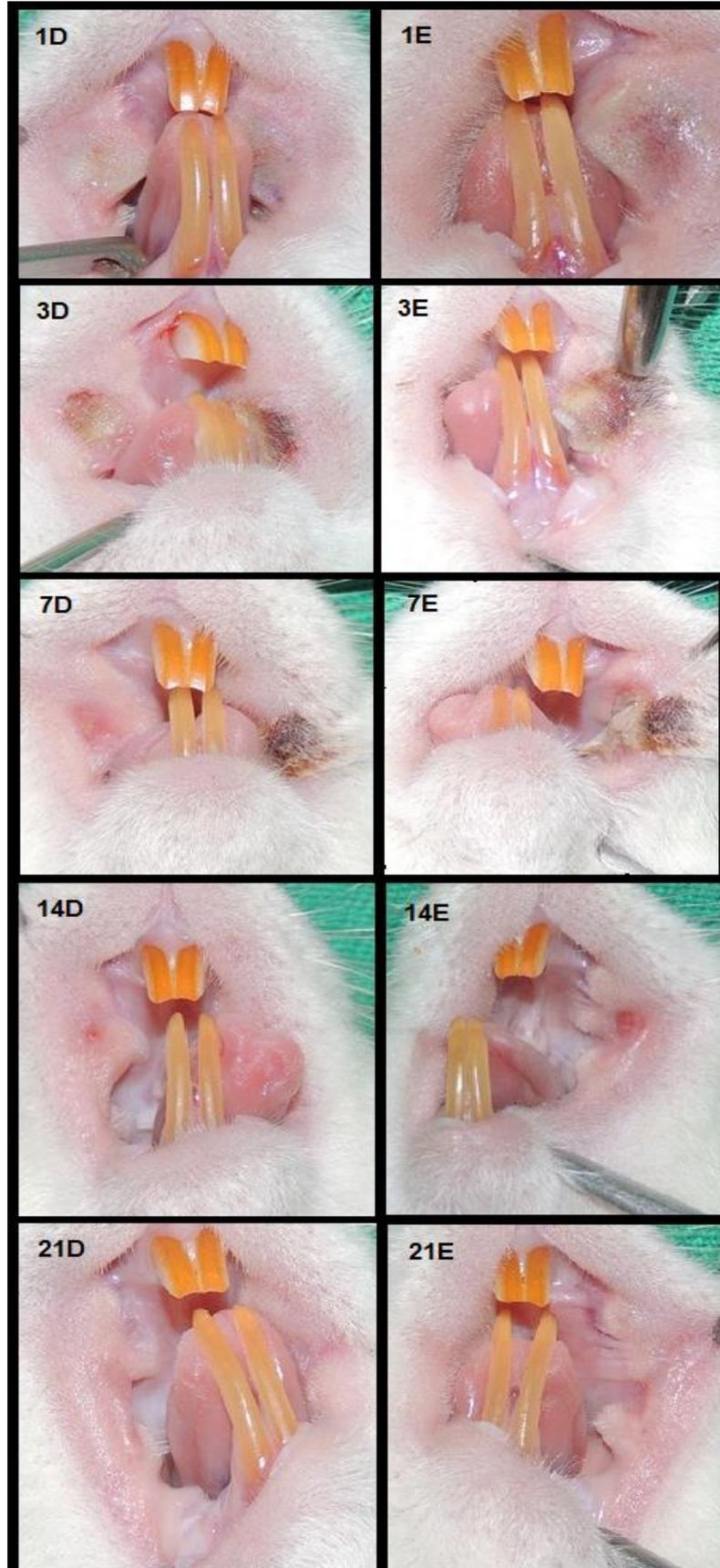


Figura 19 – Avaliações clínicas. Aspecto das lesões da mucosa bucal nos 5 períodos pós-operatórios. Notar a evolução da cicatrização da criolesão. D = Endo-Frost, E = Nitrogênio líquido.

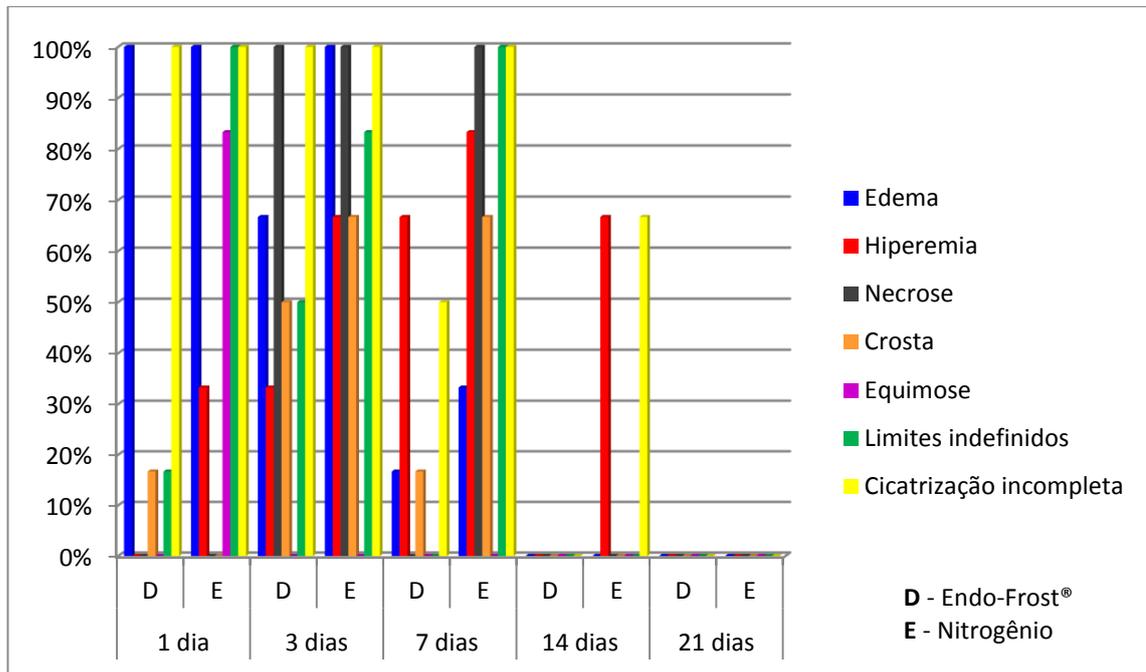


Figura 20 – Gráfico da análise macroscópica das feridas.

Observou-se no estudo que, clinicamente, a variável edema esteve presente em todos os animais no 1º, 3º e 7º dia. Esta alteração não foi observada a partir do 14º dia em todos os animais. O Endo-Frost® causou menos casos de edema no 3º e 7º dia.

Quanto à hiperemia, notou-se que esta alteração esteve mais presente do 1º ao 14º dia no tratamento com nitrogênio líquido, porém com 21 dias ambos os tratamentos apresentavam resultados iguais. Observou-se também que o Endo-Frost® só causou hiperemia no 3º e 7º dia e sempre em menor proporção que o nitrogênio líquido.

Quanto à necrose, notou-se que esta alteração não esteve presente no 1º, 14º e 21º dia com os dois tratamentos. Todos os casos apresentavam necrose no 3º dia. Entretanto, apenas o nitrogênio líquido apresentou necrose no 7º dia, atingindo 100% dos animais.

Quanto à crosta, notou-se que esta alteração teve início no 1º dia, utilizando o Endo-Frost®, e somente teve início no 3º dia para o grupo do nitrogênio líquido. No 3º e 7º dia a formação de crosta foi sempre maior para o nitrogênio líquido. Porém, com 14º e 21º dia nenhum animal apresentava mais crosta.

Quanto à equimose, notou-se que esta alteração esteve presente somente no 1º dia do grupo do nitrogênio líquido. Nos demais dias, não se observou equimose com os dois tratamentos.

Quanto aos limites indefinidos, notou-se que quase todos os casos tratados com nitrogênio líquido apresentavam limites indefinidos do 1º ao 7º dia do experimento. No grupo-experimental, com o uso do Endo-Frost®, do 7º dia em diante já não se observava indefinição das margens da lesão.

Quanto à cicatrização incompleta, observou-se que todos os casos não apresentavam cicatrização completa no 1º e 3º dia, persistindo este quadro até o 7º dia apenas para o grupo-controle. No grupo do Endo-Frost®, 50% dos casos já apresentavam cicatrização completa com sete dias. No 14º o grupo-experimental apresentava cicatrização completa e o grupo-controle finalizou a cicatrização no 21º dia.

5.3 Análise microscópica

Para facilitar a interpretação visual dos resultados, utilizou-se um gráfico resumindo os efeitos histológicos da crioterapia (Figura 21). Além disso, foram criados gráficos de cada critério morfológico para simplificar a análise (APÊNDICES I, J e K).

Observou-se no estudo que, histologicamente, a variável edema esteve presente na maioria dos animais até o 14º dia, porém, com 21 dias, todas as amostras estavam livres de edema.

Quanto à bolha, notou-se que esta alteração esteve mais presente no 1º dia, com 83,3% dos indivíduos afetados com os dois materiais testados. No grupo-controle o número de casos permaneceu estável no 3º, 7º e 14º dia. No grupo do gás refrigerante propano-butano, o número de casos bolha apresentou uma tendência de regressão até o 7º dia, porém no 14º dia voltou ao mesmo patamar do 3º dia (66,7% com alteração). No período de 21 dias as bolhas estavam ausentes em todos os animais.

Com relação à desestruturação epitelial, 100% de alteração foi observada no 1º e 3º dia para os dois grupos. A partir do 7º dia, iniciou-se uma recuperação gradativa do tecido até a sua reestruturação total com 21 dias.

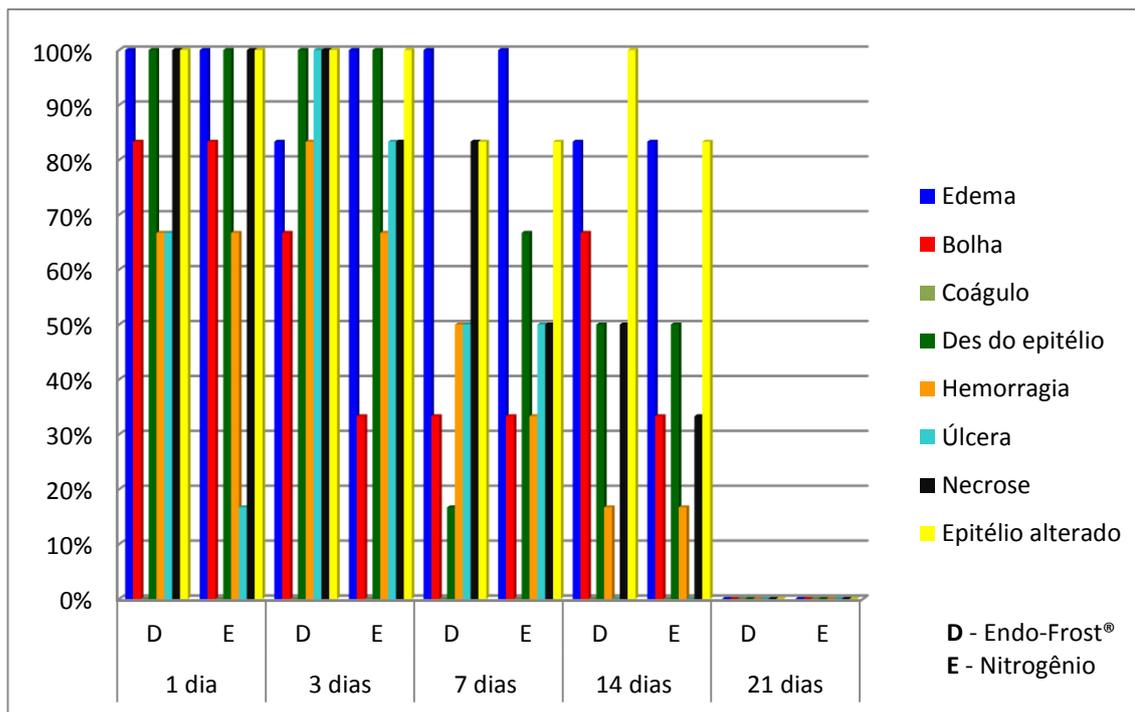


Figura 21 – Gráfico da análise microscópica das feridas.

Quanto à hemorragia, notou-se maior destaque desta alteração no 1º e 3º dia, com aproximadamente 67% dos indivíduos afetados. Uma queda gradativa foi notada até a sua total ausência com 21 dias.

Quanto à úlcera, observou-se uma maior presença desta lesão no 1º, 3º e 7º dia, atingindo seu pico máximo no 3º dia. Entretanto, após 14º dia todas as amostras estavam livres desta alteração.

Com relação à necrose, notou-se quase 100% desta lesão no 1º e 3º dia para os dois grupos (teste e controle). No 7º e 14º dia, uma queda gradativa da necrose foi observada. Com 21 dias, as amostras não apresentavam necrose.

Quanto ao epitélio alterado, observou-se que a maioria das amostras apresentava alguma alteração até o 14º dia. Contudo, no 21º dia, todo tecido epitelial avaliado estava normal.

Os resultados obtidos para os parâmetros avaliados são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Número de casos de cada parâmetro avaliado no aspecto morfológico. Campo Grande, MS, 2014

	1 dia		3 dias		7 dias		14 dias		21 dias	
	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E
Análise macroscópica										
Edema	6	6	4	6	1	2	0	0	0	0
Hiperemia	0	2	2	4	4	5	0	4	0	0
Necrose	0	0	6	6	0	6	0	0	0	0
Crosta	1	0	3	4	1	4	0	0	0	0
Equimose	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0
Limites indefinidos	1	6	3	5	0	6	0	0	0	0
Cicatrização incompleta	6	6	6	6	3	6	0	4	0	0
Análise microscópica										
Edema	6	6	5	6	6	6	5	5	0	0
Bolha	5	5	4	2	2	2	4	2	0	0
Coágulo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Desestruturação do epitélio	6	6	6	6	1	4	3	3	0	0
Hemorragia	4	4	5	4	3	2	1	1	0	0
Úlcera	4	1	6	5	3	3	0	0	0	0
Necrose	6	6	6	5	5	3	3	2	0	0
Epitélio alterado	6	6	6	6	5	5	6	5	0	0

D - Tratamento com Endo-Frost®

E - Tratamento com nitrogênio líquido

Para avaliação da resposta inflamatória, realizou-se uma análise histológica semiquantitativa de todas as amostras. Visando facilitar a interpretação visual destes resultados, utilizou-se de gráficos com cada alteração estudada na resposta inflamatória (APÊNDICES L e M).

Quanto ao tipo, notou-se que no 1º dia predominou a resposta inflamatória aguda e mista, sendo que esta foi maior no grupo do nitrogênio líquido e aquela no grupo-experimental. No 3º dia a resposta mista foi de 66,7% para os dois grupos, marcando também o início da resposta crônica no grupo-experimental. O sétimo dia foi marcado pelo predomínio da resposta inflamatória crônica, porém o grupo-controle ainda apresentava uma resposta aguda (33,3%). A partir do 14º dia houve um predomínio da resposta inflamatória crônica que permaneceu no mesmo patamar até o 21º dia.

Com relação à intensidade, até o 3º dia predominou a resposta inflamatória severa, com aproximadamente 75% dos casos, seguido pela resposta moderada. No

7º dia, encontravam-se a resposta leve, moderada e severa. Após o 14º dia predominou a resposta inflamatória leve (aproximadamente 75% dos casos). Com 21 dias o grupo do Endo-Frost® já apresentava cura e o do nitrogênio líquido ainda tinha inflamação moderada.

Quanto à extensão, até o 3º dia a lesão envolvia mais que 50% da área examinada para os dois grupos. No 7º dia as lesões variavam de 20% a mais de 50% da área avaliada. Com 14 e 21 dias, a maior parte das lesões envolvia até 20% da área examinada.

Com relação ao estado geral da mucosa, até o 3º dia predominou a necrose tecidual. Um caso de abscesso foi observado no grupo do gás refrigerante propano-butano no 3º dia. No 7º dia houve um equilíbrio entre necrose e a presença de inflamação, porém no 14º dia predominou a presença de inflamação, mas ainda com a necrose sendo observada. No 21º dia aproximadamente metade dos casos estavam sem reação inflamatória e com a mucosa íntegra ao nível histológico. Os resultados obtidos para os parâmetros avaliados são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Número de casos de cada parâmetro avaliado na resposta inflamatória. Campo Grande, MS, 2014

	1 dia		3 dias		7 dias		14 dias		21 dias	
	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E
Tipo										
Ausente	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Crônica	0	0	1	0	4	3	5	5	5	5
Mista	2	5	4	4	2	1	1	1	0	1
Aguda	4	1	1	2	0	2	0	0	0	0
Intensidade										
Ausente	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Leve	0	0	0	0	1	1	4	4	5	5
Moderada	1	2	2	1	3	2	1	1	0	1
Severa	5	4	4	5	2	3	1	1	0	0
Extensão										
Ausente	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Leve	0	0	0	0	2	1	4	4	5	5
Moderada	1	2	2	1	2	2	1	1	0	1
Severa	5	4	4	5	2	3	1	1	0	0
EG Mucosa										
S/ inflamação	0	0	0	0	0	0	0	0	3	4
C/ inflamação	0	2	0	0	4	3	5	5	3	2
Abscesso	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Necrose	6	4	5	6	2	3	1	1	0	0

D - Tratamento com Endo-Frost®

E - Tratamento com nitrogênio líquido

Os principais achados da análise histológica da mucosa bucal de ratos, com os dois criógenos, são representados nas figuras de 22 ao 30.

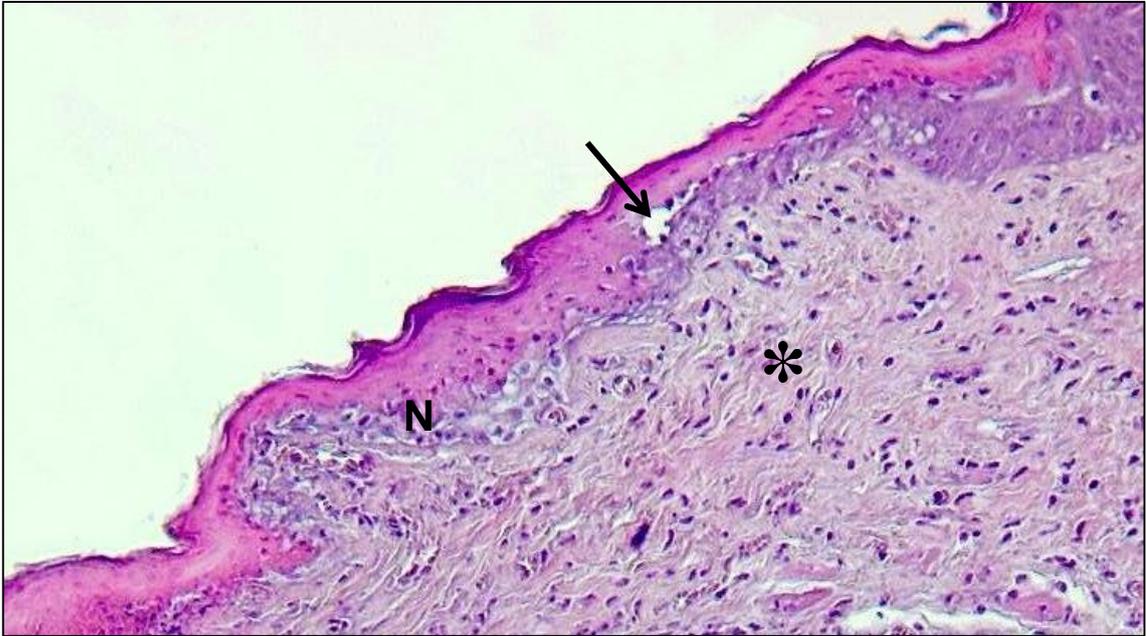


Figura 22 - Grupo do Endo-Frost® (1 dia). Epitélio com início de bolha (seta) e necrose (N). Lâmina própria com edema e infiltrado inflamatório misto e intenso (*). Magnificação de 100x.

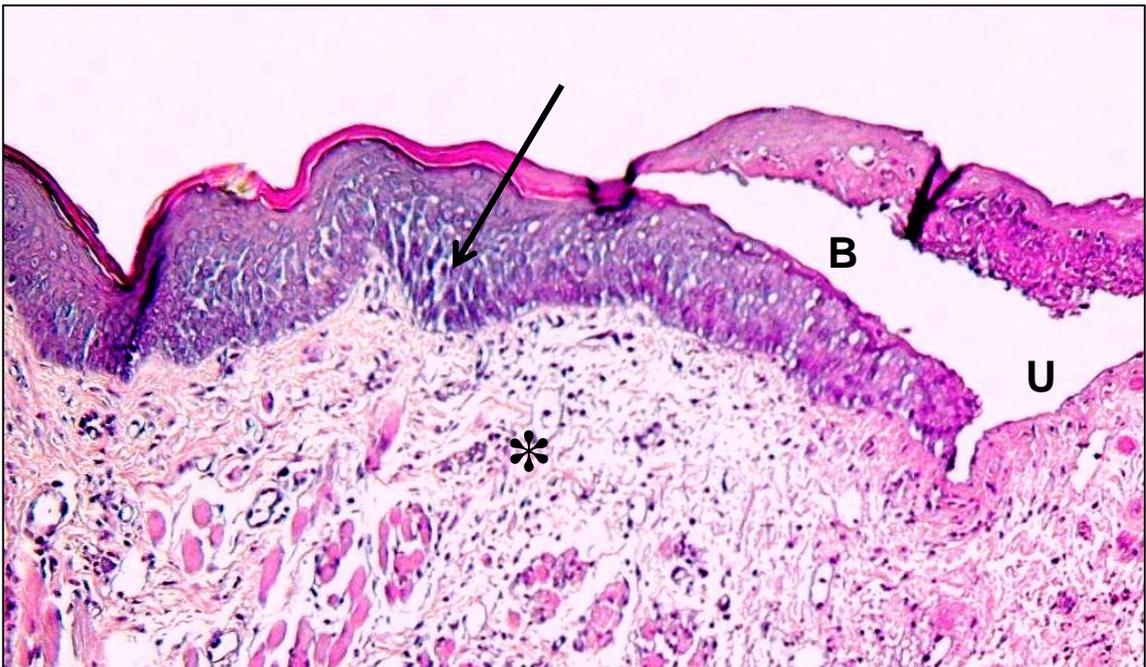


Figura 23 - Grupo do N₂ (1 dia). Epitélio com bolha (B), úlcera (U) e acantólise (seta). Lâmina própria com edema. Magnificação de 100x.

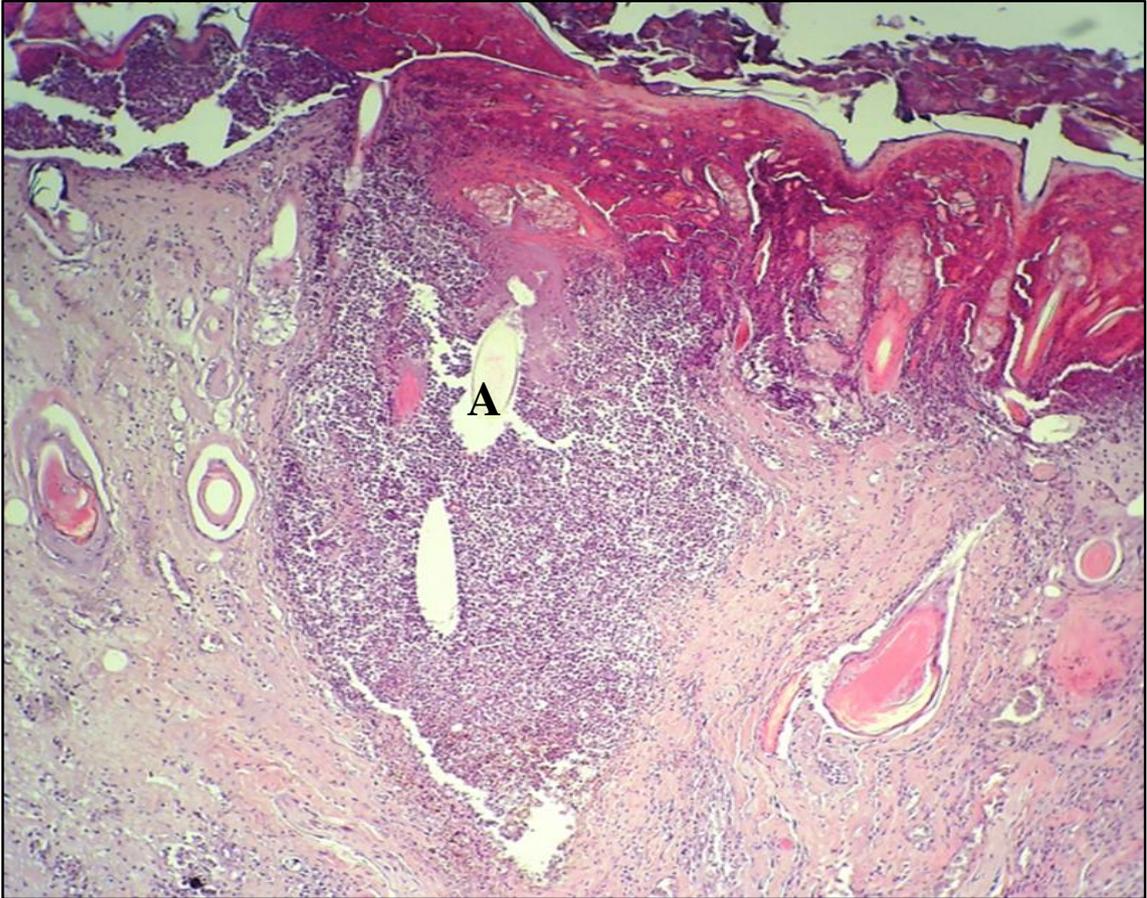


Figura 24 - Grupo do Endo-Frost® (3 dias). Notar a formação de um abscesso subepitelial (A) com infiltração neutrofílica na lâmina própria. Magnificação de 40x.

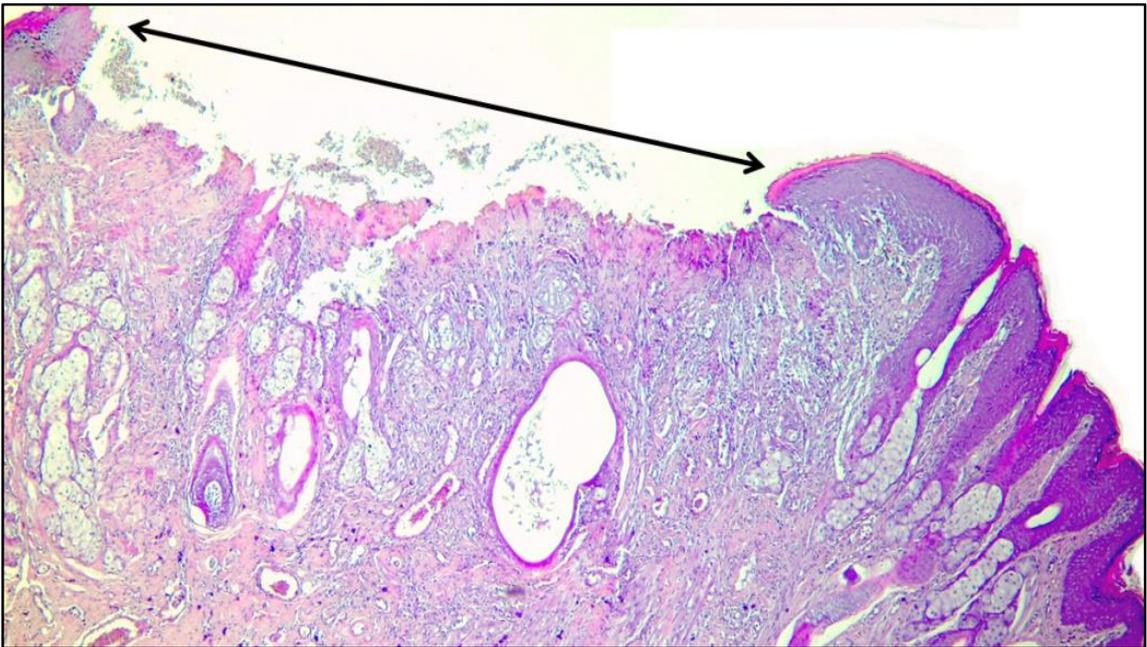


Figura 25 - Grupo do Endo-Frost® (7 dias). Vista panorâmica da úlcera no tecido epitelial (seta). Magnificação de 40x.



Figura 26 - Grupo do Endo-Frost® (7 dias). Úlcera com necrose superficial (U); formação de microbolhas subepiteliais (seta); e edema generalizado no conjuntivo e intenso processo inflamatório (*). Magnificação de 100x.

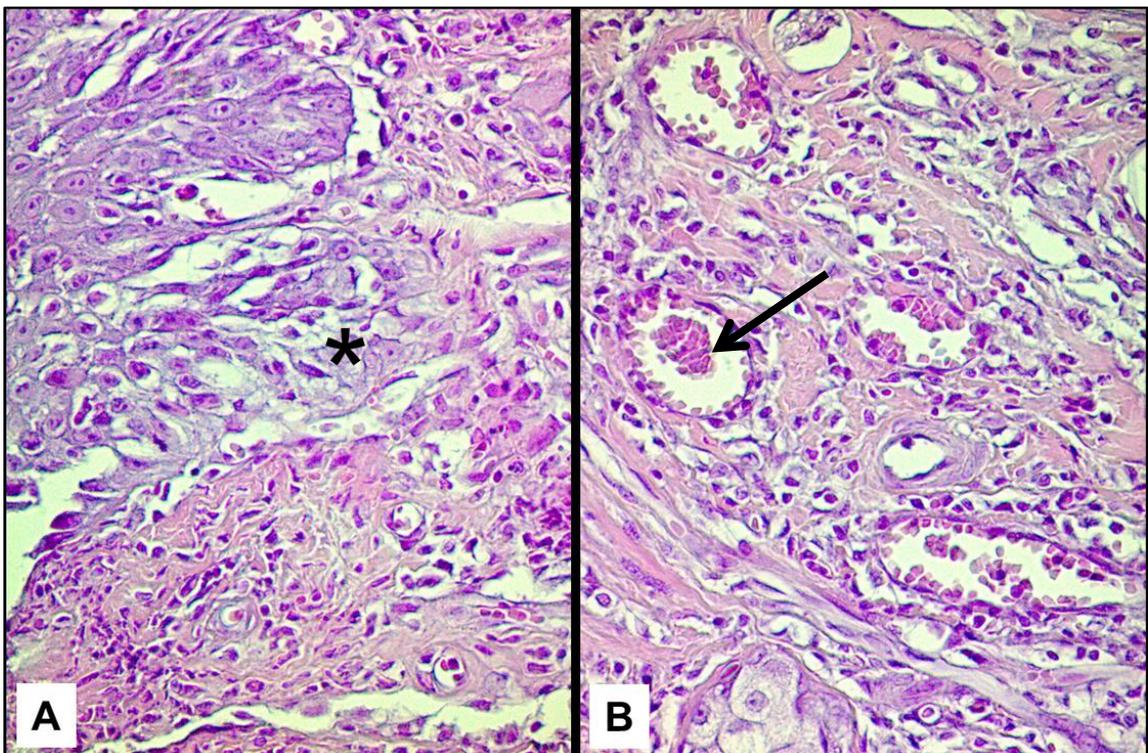


Figura 27 - Grupo do Endo-Frost® (7 dias). A - Detalhe das bolhas subepiteliais (*). B - Vasos sanguíneos congestionados (seta), infiltrado inflamatório crônico e edema tecidual. Magnificação de 400x.

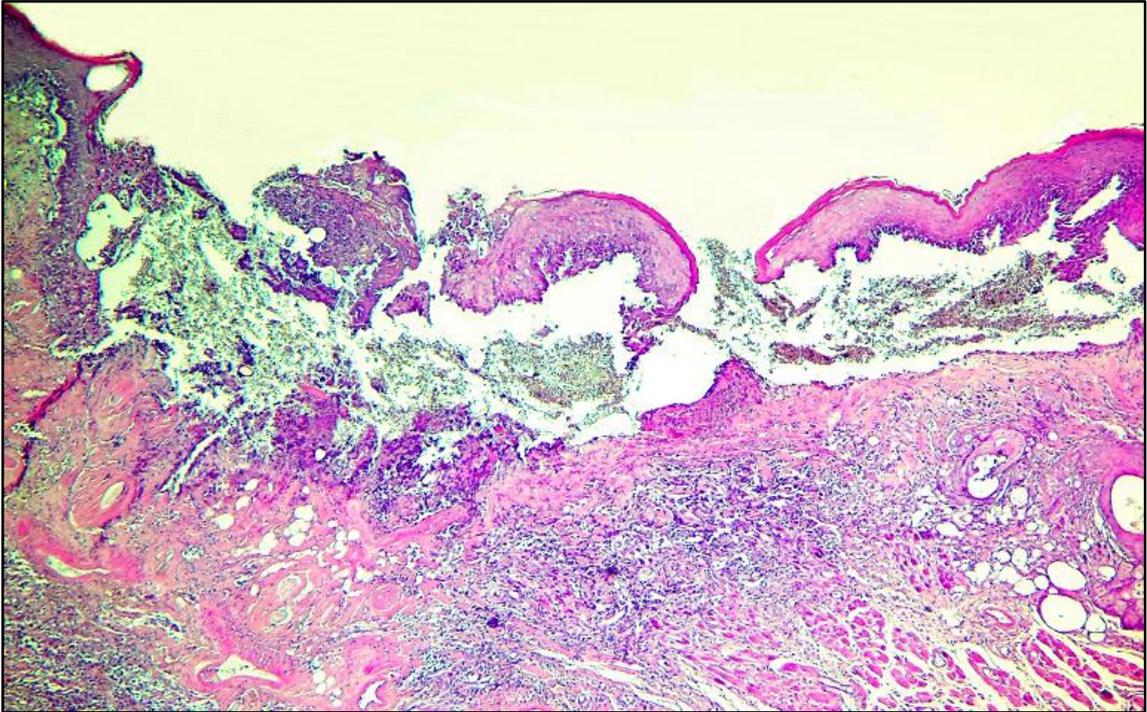


Figura 28 - Grupo do N₂ (7 dias). Vista panorâmica da bolha com exsudação sero-hemorrágica com infiltrado inflamatório moderado. Magnificação de 40x.

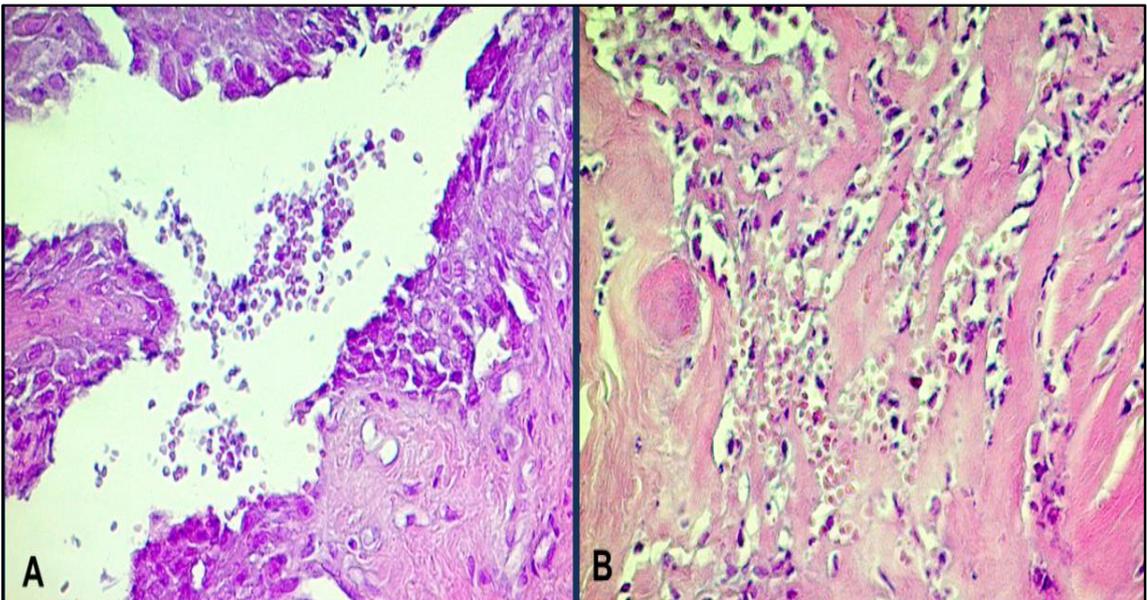


Figura 29 - Grupo do N₂ (7 dias). A) Notar a bolha intraepitelial com exsudação hemorrágica. B) Necrose do tecido conjuntivo com focos hemorrágicos e infiltrado inflamatório crônico. Magnificação de 400x.

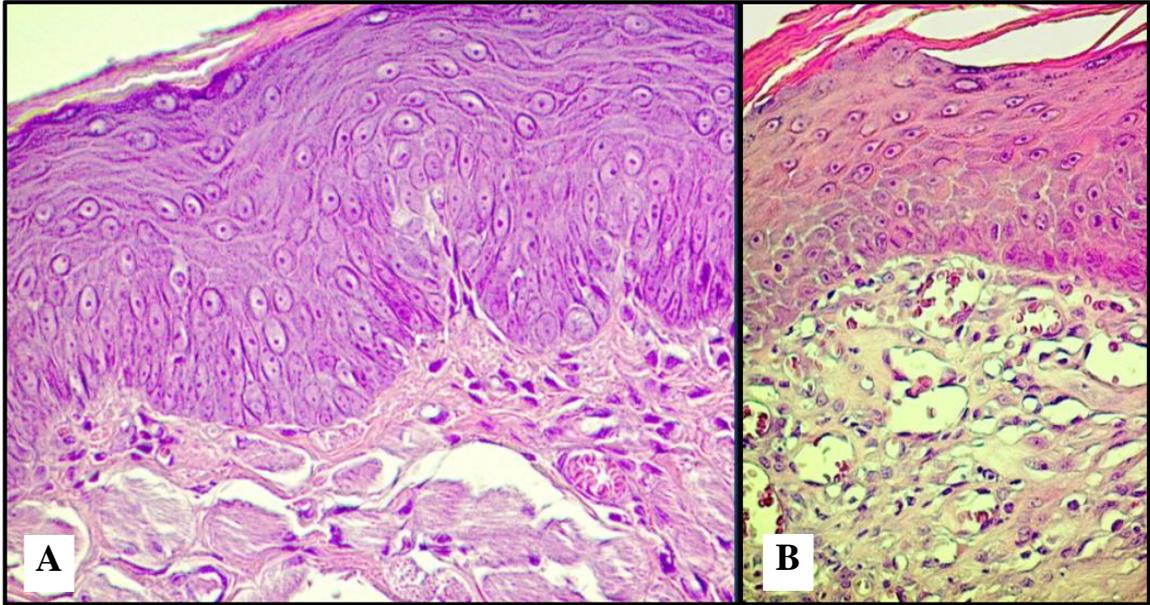


Figura 30 – Grupos teste (A) e controle (B) com 21 dias. A) Epitélio com estratificação em ordenação; lâmina própria com menos vasos sanguíneos, bem estruturada e com células inflamatórias crônicas e de intensidade leve. B) Epitélio proliferativo com figuras de mitose e estratificação próximo do normal; lâmina própria com edema, grande quantidade de vasos sanguíneos e infiltrado inflamatório leve. Magnificação de 400x.

6 DISCUSSÃO

Testes para avaliação de uma terapia, medicamento ou material são restritos em humanos, pois alguns destes testes envolvem a remoção de tecido vivo para análise. Desta forma, modelos alternativos são necessários, justificando assim os modelos experimentais em animais.

Os animais têm sido muito utilizados nas pesquisas para se testar diversos protocolos de crioterapia com nitrogênio líquido, conforme os trabalhos de Schmelzeisen et al. (1989), Pogrel et al. (1996), Santos e Sant'ana-Filho (2002), Beltrão (2003), Silva (2003), Scortegagna e Sant'ana-filho (2004). A eliminação de fatores genéticos aleatórios através do uso de linhagens puras, associado ao seu metabolismo acelerado, permitem resultados mais fidedignos em um menor lapso temporal.

Desde que a criocirurgia passou a ser utilizada na cavidade bucal, na década de 60 (EMMINGES et al., 1967), novos aparelhos têm sido desenvolvidos e vários tipos de protocolos de aplicação têm sido utilizados para a obtenção de melhores resultados. Durante a década de 70 e 80, período no qual a criocirurgia tornou-se uma técnica mais difundida e apreciada, com estudos sérios em relação ao efeito nos mais variados tecidos, vários tipos de aparatos e criógenos surgiram para aplicação da crioterapia. Contudo, esta aparelhagem tornou a criocirurgia mais complicada e de difícil acesso ao cirurgião-dentista (TOIDA et al., 1993; SANTOS; SANT'ANA-FILHO, 2002; BELTRÃO, 2003; PRASAD et al., 2009; BUBLITZ et al., 2010).

Com os resultados deste trabalho, confirma-se que é possível provocar necrose tecidual na mucosa bucal sem que haja necessidade de uma aparelhagem de custo elevado. O gás refrigerante tetrafluoretano já foi utilizado como agente criogênico para tratamento de pigmentações antiestéticas da gengiva (KUMAR et al., 2012; SINGH et al., 2012; KUMAR et al., 2013;) e como parte do tratamento de tumores benignos da cavidade bucal (MENDONÇA et al., 2011). Este e outros gases refrigerantes são utilizados na odontologia, geralmente, para realização de testes de vitalidade pulpar (MOURA-NETTO et al., 2007; SINGH et al., 2012). Entretanto, nenhum estudo experimental avaliou seus efeitos na mucosa bucal e comparou com os efeitos do nitrogênio líquido, criógeno este reconhecido como padrão-ouro na técnica de criocirurgia.

Com o intuito de se realizar a criocirurgia em lesões da cavidade bucal, devido aos relatos de suas vantagens e, principalmente, como opção terapêutica de baixo custo, pesquisou-se, neste trabalho, o efeito local da aplicação do gás refrigerante propano-butano na mucosa bucal de ratos, comparando seus efeitos com os do nitrogênio líquido. Os períodos de observação foram 1, 3, 7, 14 e 21 dias. Períodos similares de observação são encontrados nos estudos de Schmelzeisen et al. (1989) e Beltrão (2003).

A crioterapia ou criocirurgia não apresenta um efeito destrutivo padronizado, já que alguns tecidos apresentam maior resistência do que outros (LEOPARD, 1975). Fatores como condutividade térmica, osmolaridade, composição celular e vascularização interferem no padrão de congelamento e descongelamento dos tecidos (LEOPARD, 1975; TAL, 1982; TAL, 1992).

Beltrão (2003) observou que o tamanho da bola de gelo depende da localização da lesão, e se esta estiver no lábio, será necessário um tempo de congelamento menor do que se estiver no palato, pois no lábio consegue-se uma destruição mais satisfatória se o mesmo protocolo for empregado. Além disso, o lábio é uma localização preferencial das lesões bucais, sendo comumente tratadas na literatura (TAL, 1992; TOIDA et al., 1993; RAMOS-E-SILVA, 1998; BELTRÃO, 2003; SHIRANI, 2008; ZIMMERMAN; CRAWFORD, 2012; ISHIDA; ISHIDA, 2013). Baseado nesses achados e por esta localização ser de fácil acesso, optou-se, nesta pesquisa, por realizar a crioterapia na mucosa bucal do lábio superior.

Observou-se em revista de literatura que não há um padrão uniforme quanto ao tempo de aplicação, quanto ao agente criogênico, quanto ao número de aplicações, nem quanto ao método utilizado. Diversos protocolos têm sido relatados, baseados em experiências próprias dos autores (HAUSAMEN, 1975; GAGE, 1978; TAL et al., 1982; TAL et al., 1987; POGREL, 1993; POGREL et al., 1996).

Em trabalhos como os de Grimmett (1961), Jarzab (1975), Leopard (1975), Reade (1979), Gongloff e Gage (1983), Tal et al. (1987), Li (1991), Gage e Baust (1998), Ishida e Ramos-E-Silva (1998), Zimmerman e Crawford (2012), tanto os sistemas abertos quanto os fechados foram utilizados de acordo com a experiência clínica dos autores, cujos critérios variavam conforme o tamanho da lesão, diagnóstico e local de congelamento.

O sistema aberto, na forma de *sprays*, apresenta diversas vantagens sobre o sistema fechado, tais como maior capacidade de congelar tecidos mais profundos,

aplicável a lesões de tecidos mole e ósseo, e pode ser utilizado em lesões mais extensas, espessas e proliferativas (HAUSAMEN, 1975; LEOPARD, 1975; READE, 1979; GONGLOFF et al., 1980; LEMOS-JÚNIOR, 1999; ZIMMERMAN, CRAWFORD, 2012).

Neste experimento, realizou-se a aplicação do gás refrigerante propano-butano e do nitrogênio líquido através de *spray*, na mucosa bucal de ratos, utilizando um dispositivo protetor para padronizar e limitar o dano tecidual. Determinou-se uma distância aproximada de 10 mm dos tecidos para permitir a criação do *spray* e permitir o congelamento deste, conforme relatado por Kumar et al. (2012).

Segundo Gongloff e Gage (1983), durante a utilização do *spray*, deve-se tomar cuidado com as áreas adjacentes ao local de aplicação para que não ocorra um congelamento iatrogênico. Um cuidado adicional deve ser tomado no uso do Endo-Frost®, pois este apresenta como produto um líquido congelante que pode causar lesão grave nos tecidos vizinhos. Recomenda-se, assim como Sako et al. (1972), Cerqueira e Sant'ana-Filho (2001), Schmidt e Pogrel (2001), Silva (2003) e Prasad et al. (2009), a proteção do tecidos adjacentes com utilização de gazes ou esponjas, podendo ser associado a estes o uso de sugadores potentes.

O número de ciclos e a duração destes foram padronizados para os dois criógenos, aplicando-se dois ciclos de congelamento como melhor opção, com relatados por Emmings et al. (1967), Leopard (1975), Gage (1978), Beltrão (2003), Silva (2003), Scortegagna e Sant'ana-Filho (2004), Gage et al. (2009) e Bansal et al. (2012). Ainda segundo estes autores, a repetição do ciclo de congelamento causa um maior dano tecidual, por expor este às mesmas condições deletérias mais de uma vez. Além disso, um segundo ciclo leva a um congelamento mais rápido e em maior volume, devido ao aumento da condutividade térmica dos tecidos, sendo vantajoso, principalmente, nas lesões mais persistentes e recidivantes (EMMINGGS et al., 1967; GAGE; BAUST, 1998; BANSAL et al., 2012).

Na pesquisa, cada ciclo durou 10 segundos. Este tempo de congelamento já foi utilizado para: avaliar a crionecrose em tecidos ósseos (SILVA, 2003; SCORTEGAGNA; SANT'ANA-FILHO, 2004); tratar lesões de glândulas salivares, tais como cisto de retenção mucoso e mucocelos (TOIDA et al., 1993; MARCUSHAMER et al., 1997; ZIMMERMAN, CRAWFORD, 2012); tratar lesões pré-malignas, como leucoplasias (PRASAD et al., 2009; RIBEIRO et al., 2012); tratar hiperpigmentações gengivais antiestéticas (TAL et al., 1987); tratar hemangiomas capilares da face

(LEOPARD; POSWILLO, 1974); tratar máculas melanóticas (YEH, 2000); e tratar diversas lesões benignas de pele e mucosas, tais como acne, angiomas, corno cutâneo, hiperplasia sebácea, ceratose seborreica, verruga vulgar e ceratose actínica (ZIMMERMAN, CRAWFORD, 2012). Confirmando sua aplicabilidade clínica.

O tempo de reaquecimento dos tecidos também é um fator importante no protocolo de crioterapia (LEOPARD; POSWILLO, 1974; LEOPARD, 1975; HAUSAMEN, 1975; TAL, 1982). Quanto mais lento o reaquecimento, maior é o dano tecidual (EMMINGS et al., 1967, LEOPARD, POSWILLO, 1974; HAUSAMEN, 1975; TAL, 1982; GAGE, 1998; GAGE; BAUST, 1998; GAGE et al., 2009; BANSAL et al., 2012).

O congelamento lento permite a recristalização dos cristais de gelo formados dentro das células, tornando-os maiores e com maior potencial lesivo para as células (HAUSAMEN, 1975; NISHIDA et al., 2011). Além disso, sabe-se que um período de reaquecimento lento favorece a desnaturação de proteínas (HAUSAMEN, 1975; BANSAL et al., 2012).

A literatura relata um tempo de reaquecimento tecidual bastante variável. O menor tempo de reaquecimento encontrado nesta revisão foi de 20 segundos ou o dobro do tempo de congelamento, que no caso foi de 10 segundos (TOIDA et al., 1993; PRASAD et al., 2009). O maior tempo de descongelamento espontâneo relatado foi de 5 minutos (POSWILLO, 1978; SANTOS; SCHMIDT; POGREL, 2001; SANT'ANA-FILHO, 2002; BELTRÃO, 2003; BUBLITZ et al., 2010; MENDONÇA et al., 2011; VYASARAYANI et al., 2014).

Nesta pesquisa, utilizou-se um tempo de reaquecimento espontâneo de 2,5 minutos. Observou-se que este período foi suficiente para permitir o reaquecimento do tecido congelado. Este mesmo tempo de reaquecimento foi relatado por Silva (2003) e Scortegagna e Sant'ana-Filho (2004). Entretanto, períodos inferiores a 2,5 minutos também foram relatados por Hurt et al. (1974), Leopard (1975), Tal et al. (1987), Tal (1992), Bansal et al. (2012) e Ribeiro et al. (2012).

Os efeitos clínicos durante e após o congelamento seguem uma sequência previsível (LEOPARD; POSWILLO, 1974; HAUSAMEN, 1975). Nas primeiras duas a três horas ocorre hiperemia e edema (LEOPARD; POSWILLO, 1974; HAUSAMEN, 1975; GONGLOFF; GAGE, 1983). Com 24 horas, ocorre um escurecimento da região e o edema se torna mais pronunciado (LEOPARD; POSWILLO, 1974; LEMOS-JÚNIOR, 1999). O edema é imediato após o descongelamento da área, aumentando

com 24 e 48 horas (EMMINGS et al., 1967; SAKO et al., 1972; JARZAB, 1975; HAUSAMEN, 1975; POSWILLO, 1978; TAL, 1982; GONGLOFF; GAGE, 1983).

O edema, devido ao acúmulo de exsudato, é comum após a criocirurgia (READE, 1979; SANTOS; SANT'ANA-FILHO, 2002). Um edema residual pode permanecer após 7 dias (HURT et al., 1972; BELTRÃO, 2003). Procedimentos de crioterapia na cavidade bucal podem produzir edemas severos e interferir na deglutição, mastigação e respiração do paciente (READE, 1979; SANTOS; SANT'ANA-FILHO, 2002).

O edema pode ser notado tanto no aspecto macroscópico como no histológico (SANTOS; SANT'ANA-FILHO, 2002). Corroborando com os achados da literatura, no presente trabalho, observou-se a presença de edema até o 7º dia no aspecto clínico e até o 14º dia no aspecto histológico para os dois grupos (experimental e controle). Entretanto, apesar de o número de casos serem equivalentes, o edema sempre foi mais acentuado nos animais tratados com o nitrogênio líquido.

A hiperemia e a equimose também foram eventos teciduais observados clinicamente neste trabalho. A hiperemia, indicando reação inflamatória (BELTRÃO, 2003), foi menor em extensão no grupo do Endo-Frost®. A equimose foi notada apenas no 1º dia no grupo do N₂. Esta alteração indica acúmulo de sangue nos tecidos, estase vascular e formação de trombos dentro dos vasos, diminuindo a circulação local (EMMINGS et al., 1967; LEOPARD, 1975; GONGLOFF; GAGE, 1983; WHITTAKER, 1984; POSWILLO, 1986; TAL, 1992).

Nota-se, principalmente nos lábios, a formação de vesículas ou bolhas, nos primeiros momentos após a aplicação do agente criogênico (BELTRÃO, 2003). Santos e Sant'ana-Filho (2002) notaram a presença de bolha em 100% dos casos tratados com *spray* de nitrogênio líquido após 6 horas. No presente trabalho, observou-se, histologicamente, a presença de bolhas até o 14º dia. Segundo Buch et al. (1979), a formação de uma vesícula subepitelial sugere destruição epitelial.

Quanto ao coágulo, não foi observada a presença desta variável em nenhum dos períodos de avaliação para os dois materiais testados. Resultados diferentes foram encontrados na literatura, com a presença de 100% de coágulo após 6 horas do congelamento (SANTOS; SANT'ANA-FILHO, 2002). Entretanto, o período de observação e o protocolo de crioterapia foram diferentes.

Quanto à hemorragia, notou-se na pesquisa um maior destaque desta alteração no 1º e 3º dia, com aproximadamente 67% dos indivíduos afetados. Uma queda

gradativa foi notada até a sua total ausência com 21 dias. Resultados diferentes foram encontrados na literatura, com a presença de 100% desta alteração após 6 horas do congelamento (SANTOS; SANT'ANA-FILHO, 2002). Porém, o período de observação e o protocolo de crioterapia também foram diferentes.

A formação de úlcera é um aspecto patológico do reparo, podendo ser resultado de vascularização insuficiente durante o processo cicatricial (VALENTE, 2014). Quanto à úlcera, observou-se na pesquisa uma maior presença desta lesão no 1º, 3º e 7º, atingindo seu pico máximo no terceiro dia. Entretanto, após 14º dia todas as amostras estavam livres desta alteração. Resultados diferentes foram encontrados na literatura, com a presença de 100% desta alteração após 6 horas do congelamento (SANTOS; SANT'ANA-FILHO, 2002). No entanto, o período de observação e o protocolo de crioterapia foram diferentes.

Com relação à desestruturação epitelial, observou-se esta alteração em 100% dos casos no 1º e 3º dia, para os dois grupos. A partir do 7º dia, iniciou-se uma recuperação gradativa do tecido até a sua reestruturação total com 21 dias. Resultados iguais foram encontrados na literatura, com a presença de 100% desta alteração após 6 horas de congelamento (SANTOS; SANT'ANA-FILHO, 2002).

A primeira manifestação clínica e histológica da necrose tecidual, assim como sua duração, é bastante variável na literatura. Ocorre uma descamação do tecido necrosado e a re-epitelização se inicia em profundidade (LEOPARD; POSWILLO, 1974; POGREL, 1993). A crionecrose pode ser visualizada após 24 horas (JARZAB, 1975; LEOPARD, 1975; TAL; GORSKY, 1987; SCHMELZEISEN et al., 1989; BELTRÃO, 2003); entre 2 e 3 dias (TAL et al., 1982; GONGLOFF; GAGE, 1983; BELTRÃO, 2003); de 3 a 5 dias (YEH, 2000); 7 dias (TAL, 1992; TAL et al., 1987; BELTRÃO, 2003); e com 9 dias (BELTRÃO, 2003).

Segundo Beltrão (2003), após 2 a 3 dias, há uma necrose superficial, que na região bucal é recoberta por uma membrana amarelada. Este mesmo autor observou a necrose labial em 70% dos casos, com 7 dias, e em 40% dos casos, com 9 dias. Resultados semelhantes aos da literatura foram observados nesta pesquisa. A necrose foi observada clinicamente no 3º e 7º dia, e notada do 1º ao 14º dia na análise histológica.

A crosta pode se formar, no local da criolesão, tanto na mucosa como na pele (LEOPARD, 1975; BELTRÃO, 2003; VALENTE, 2014). Durante a cicatrização, as crostas começaram a se desprender das bordas da ferida até se soltarem

completamente. O período de formação e desprendimento das crostas varia de acordo com o protocolo de congelamento e com o tipo de tecido congelado (VALENTE, 2014).

Beltrão (2003) notou que nos dois primeiros dias não há formação de crosta no lábio tratado com nitrogênio líquido. Em 3 dias, este autor visualizou a crosta em 70% dos indivíduos, e com 5 dias notou 100% dos casos com crosta. Deste momento em diante ocorreu um decréscimo linear da presença de crosta até seu desaparecimento total no 14º dia.

Na presente pesquisa, a crosta teve início já no 1º dia para o grupo tratado com Endo-Frost[®], demonstrando um reparo precoce dos tecidos. Esta variável só foi observada no 3º dia para o grupo-controle. A partir do 14º a crosta não foi mais observada nos dois grupos, confirmando os achados da literatura.

Quanto aos limites indefinidos, vê-se que a lesão se comportou desta forma até o 3º dia para o grupo do gás refrigerante e até o 7º para o grupo-controle. Beltrão (2003) também observou, com o uso do nitrogênio líquido com hastes de algodão, que 100% dos casos apresentavam limites indefinidos no 1º dia. Entretanto, este mesmo autor notou a ausência desta variável no 7º dia pós-operatório.

A cicatrização das lesões causadas pela criocirurgia se dá por segunda intenção, formando um novo epitélio no local da criolesão (LEOPARD, 1975; POSWILLO, 1986). O período para a completa cicatrização das lesões causadas pela crioterapia é bastante variado na literatura. A cicatrização pode ser observada a partir de 10 dias, podendo chegar até 5 semanas (EMMINGS et al., 1967; SAKO et al., 1972; LEOPARD; POSWILLO, 1974; JARZAB, 1975; HAUSAMEN, 1975; BUCH et al., 1979; GONGLOFF et al., 1980; TAL, 1982; GONGLOFF; GAGE, 1983; TAL et al., 1987; SCHMELZEISEN et al., 1989; SANTOS; SANT'ANA-FILHO, 2002; BELTRÃO, 2003). Esta variação se justifica, pois muitos destes pesquisadores não padronizaram seus protocolos de aplicação de crioterápicos ou porque as lesões tratadas diferiram muito em relação às suas dimensões.

Clinicamente, o grupo tratado com gás refrigerante propano-butano apresentou cicatrização completa com 14 dias, corroborando com os achados de Sako et al. (1972), Buch et al. (1979) e Beltrão (2003). Entretanto, com 14 dias apenas 50% dos animais que foram tratados com nitrogênio líquido apresentavam cicatrização completa. Esta diferença deve-se à técnica de aplicação do criógeno na forma de *spray*, que segundo Toida et al. (1993) e Santos e Sant'ana-Filho (2002), causa danos teciduais mais extensos e profundos do que a técnica com hastes de algodão. A

cicatrização completa ocorreu apenas com 21 dias no grupo do nitrogênio líquido, assim como os achados de Gongloff e Gage (1983), Tal et al. (1987) e Bublitz et al. (2010).

Histologicamente, observou-se que a maioria das amostras da pesquisa apresentava alguma alteração tecidual até o 14^o dia. Contudo, no 21^o dia, os tecidos epitelial e conjuntivo estavam em processo avançado de reparo nos dois grupos, com epitélio proliferativo e com estratificação em ordenação.

Desta forma, observa-se que os resultados obtidos na análise macroscópica e histológica estão de acordo com a literatura, pois o reparo tecidual aconteceu em um período muito semelhante aos referidos em outros estudos.

A resposta inflamatória é um processo importante no reparo das feridas. As lesões causadas pela criocirurgia geralmente provocam uma mínima resposta inflamatória periférica (LEOPARD, 1975; VALENTE, 2014). Segundo Maccini et al. (2011), a liberação de mediadores vasoativos resulta no influxo de células inflamatórias, principalmente neutrófilos e macrófagos, para o local da criolesão.

De acordo com Valente (2014), a reação inflamatória aguda é caracterizada pela curta duração, aumento da permeabilidade vascular, exsudação de fluidos e proteínas plasmáticas e migração de leucócitos, principalmente neutrófilos. Uma necrose por coagulação é observada no centro do local da criocirurgia, com a presença de neutrófilos na zona periférica (VALENTE, 2014).

Schmelzeisen et al. (1989) notaram, 3^o dia, um extenso infiltrado inflamatório e a criolesão atingiu seu diâmetro máximo. Hurt et al. (1972) observou que com três dias um exsudato inflamatório intenso estava presente, composto em sua maioria por neutrófilos. Além disso, notou a presença de células gigantes junto à camada basal. No 4^o dia, uma maior invasão de neutrófilos foi observada.

Resultados similares foram observados neste estudo comparativo do gás refrigerante propano-butano e nitrogênio líquido. Notou-se que no 1^o e 3^o dia predominou a resposta inflamatória intensa e aguda, envolvendo mais de 50% da área examinada.

No 4^o dia de pós-operatório, Schmelzeisen et al. (1989) observaram a presença de abscessos subepiteliais. Esta alteração também foi notada no 3^o dia neste estudo, porém em apenas um caso tratado com o gás refrigerante. Contudo, esta alteração não se manifestou clinicamente.

O processo de "limpeza" celular pode durar de semanas a meses (MACCINI et al., 2011). Áreas menores de necrose são acompanhadas de reação inflamatória que desaparecem em poucas semanas, enquanto que áreas de destruição moderadas apresentam regeneração após 1 a 2 meses (GAGE, 1978). Segundo Valente (2014), a reação inflamatória crônica depende da não resolução do processo de fase aguda e, geralmente, possui longa duração. Esta fase caracteriza-se pela persistência de macrófagos e linfócitos, além de angiogênese, e proliferação de tecido epitelial e conjuntivo (VALENTE, 2014).

No presente estudo, observou-se que no 14^o e 21^o dia houve um predomínio da resposta inflamatória crônica e leve (quanto à intensidade e extensão), confirmando outros estudos que afirmam uma longa duração deste processo crônico.

Após o congelamento do tecido, poucos cuidados são necessários. Pode haver um pequeno desconforto, mas uma dieta líquida é normalmente bem tolerada (SANTOS; SANT'ANA-FILHO, 2002). O período de descamação do tecido necrótico é o período de maior desconforto e pode ser tratado com irrigações ou bochechos, removendo-se o tecido necrosado (EMMINGS et al., 1967; JARZAB, 1975; GONGLOFF et al., 1980).

A criocirurgia é relativamente indolor e sem grande desconforto no pós-operatório, provavelmente devido à destruição das fibras nervosas periféricas pela ação do frio (HURT et al., 1972; POSWILLO, 1978; BARNARD, 1980; WHITTAKER, 1984; SCHMIDT; POGREL, 2004; GAGE et al., 2009). Porém, a capacidade de preservação dos nervos, mesmo com a destruição das células tumorais adjacentes a estes, tem sido relatada (LEOPARD; POSWILLO, 1974; SCHMIDT; POGREL, 2004; GAGE et al., 2009). Isto justifica a boa aceitação desta técnica por parte dos pacientes (EMMINGS et al., 1967; SAKO et al., 1972; GONGLOFF et al., 1980).

Um achado comum é o fato de que as áreas de pele e mucosa tratadas com criocirurgia permaneçam anestesiadas por um período de várias semanas (BARNARD, 1980). Após este período há um completo retorno da sensibilidade (LEOPARD; POSWILLO, 1974; HAUSAMEN, 1975; POSWILLO, 1978; BARNARD, 1980; TAL, 1982).

Na pesquisa, com relação à dor e o comportamento dos animais, notou-se que, já no primeiro dia de pós-operatório, estes se alimentavam, porém com alguma restrição devido ao edema labial bilateral. Os animais não manifestaram sinais de dor

durante todo período de observação, bem como se mantiveram ativos, dóceis e apresentando normofagia, normodipsia, normúria e normoquesia, tendo ao final do experimento um incremento médio de 38 gramas nos seus pesos corporais. Este mesmo critério foi utilizado por Valente (2014) para avaliar a dor após criocirurgia em ratos Wistar.

A criocirurgia oferece grande vantagem em relação à excisão convencional, pois oferece menor risco de sangramento e infecção no pós-operatório (GETTER; PEREZ, 1972; HURT et al., 1972; MARCUSHAMER et al., 1997; YEH, 2000; SHIRANI 2008, BUBLITZ et al., 2010; RIBEIRO et al., 2012; SINGH et al., 2012; VYASARAYANI et al., 2014). Além disso, esta técnica não necessita remoção de qualquer tecido (YEH, 2000; SHIRANI 2008).

Quanto ao sangramento e às infecções, resultados semelhantes foram encontrados nesta pesquisa. Durante o período do experimento, não se observou hemorragia ou infecção visível ao exame clínico para os dois tratamentos realizados.

Experimentos em animais de laboratório têm confirmado impressões clínicas de que a cicatrização após a criocirurgia dá-se por regeneração, no qual a quantidade de colágeno encontrado nas cicatrizes é apreciavelmente menor do que nas produzidas por bisturi frio ou elétrico (HURT et al., 1972; BUCH et al., 1979; TAL et al., 1982).

Os resultados estéticos após a aplicação da criocirurgia são promissores (SANTOS; SANT'ANA-FILHO, 2002; ZIMMERMAN; CRAWFORD, 2012). O tratamento pode ser repetido quantas vezes forem necessárias sem formar cicatrizes fibrosas, o que é importante em área estética da face e em sulcos anatômicos (SANTOS; SANT'ANA-FILHO, 2002). A regeneração tecidual, sem a formação de cicatriz, oferece uma grande vantagem quando comparada a excisão cirúrgica (TAL, 1992; YEH, 2000; BUBLITZ et al., 2010).

No período de observação de 21 dias, notou-se formação de uma pequena cicatriz, porém a cicatrização até este período evoluiu sem formação de fibrose ou limitação da movimentação do lábio. A cicatriz formada foi discreta e provavelmente desapareceria se o período de acompanhamento fosse um pouco maior.

A crioterapia apresenta diversas vantagens segundo a literatura. Esta técnica é segura, barata, eficaz e de fácil execução (POGREL, 1993; SANTOS; SANT'ANA-FILHO, 2002; BANSAL et al., 2012). Além disso, é uma técnica que: conserva os tecidos, pois evita ressecções amplas ou até reconstruções com enxertos; preserva o

arcabouço para o reparo dos tecidos como nervos, vasos e osso; possibilita o tratamento de várias lesões da cavidade bucal e da face; não necessita de suturas ou curativos; não apresenta sangramentos ou infecções; praticamente não causa dor; não gera cicatriz antiestética; pode ser repetida várias vezes; pode ser utilizada no tratamento de pigmentações antiestéticas de gengiva; pode ser indicada em paciente com problemas sistêmicos, como coagulopatias, hipertensão e outros; e pode ser usada no tratamento de lesões muito extensas, devido ao baixo risco de ocorrer cicatrização fibrótica e comprometimento funcional (EMMINGS et al., 1967; GETTER; PEREZ, 1972; HURT et al., 1972; SAKO et al., 1972; LEOPARD, 1975; POSWILLO, 1978; TAL et al., 1987; POGREL, 1993; POGREL et al., 1996; MARCUSHAMER et al., 1997; ISHIDA; RAMOS-E-SILVA, 1998; THAI; SINCLAIR, 1999; YEH, 2000; SCHIMDT; POGREL, 2001; SANTOS; SANT'ANA-FILHO, 2002; SHIRANI 2008; BUBLITZ et al., 2010; COSTA et al., 2010; MENDONÇA et al., 2011; BANSAL et al., 2012; KUMAR et al., 2012; RIBEIRO et al., 2012; SINGH et al., 2012; ZIMMERMAN; CRAWFORD, 2012; KUMAR et al., 2013; VYASARAYANI et al., 2014).

Algumas desvantagens também são relatadas na literatura. As principais desvantagens são: necrose imprevisível e destruição não seletiva dos tecidos; necessidade de várias aplicações, dependendo do tipo de lesão; risco de edema excessivo e prolongado, principalmente na região de lábios, língua, faringe e amígdala, com risco de prejudicar a deglutição, a fonação e a respiração; formação de fibrose em lesões muito amplas, porém em menor proporção que a cirurgia convencional; risco de exposição e sequestro ósseo; risco de anquilose dental, quando aplicado próximo à raiz dos dentes; despigmentação da pele, no caso de pacientes melanodermas; risco de sialoadenite transitória, quando aplicado próximo dos ductos salivares; e falta de material para análise histopatológica (LEOPARD, POSWILLO, 1974; LEOPARD, 1975; MARCIANI, TRODAHL, 1975; READE, 1979; POSWILLO, 1986; TURJANSKY; STOLAR, 1992; POGREL, 1993; ISHIDA; RAMOS-E-SILVA, 1998; SANTOS; SANT'ANA-FILHO, 2002; ZIMMERMAN; CRAWFORD, 2012). Contudo, as vantagens superam facilmente as desvantagens com o uso da crioterapia (LEOPARD, 1975; SANTOS; SANT'ANA-FILHO, 2002; GAGE et al., 2009).

Além destas vantagens e desvantagens comuns aos criógenos de maneira geral, a técnica de criocirurgia com o uso do gás refrigerante propano-butano apresentou, nesta pesquisa, algumas vantagens adicionais. O custo do criógeno Endo-Frost® foi mais baixo, pois não necessita de aparelhagem específica para

produção do *spray*. Outro fator relevante é que este produto pode ser utilizado pelo cirurgião-dentista para outra finalidade que não a crioterapia. Além disso, a vida útil do produto é maior, pois depende apenas do período de validade do produto, uma vez que este não apresenta evaporação espontânea como o nitrogênio líquido.

O gás refrigerante propano-butano foi capaz de causar danos à mucosa bucal de ratos, de forma similar ao nitrogênio líquido, mesmo com menor potencial de atingir baixas temperaturas. Isto pode ser benéfico no tratamento de lesões da cavidade bucal, onde se espera um edema maior e com riscos de comprometer funcionalmente a respiração, mastigação e fonação (READE, 1979; SANTOS; SANT'ANA-FILHO, 2002). O edema observado com uso do gás refrigerante, mesmo que estatisticamente equivalente em número de casos, sempre foi em menor proporção que o causado pelo nitrogênio líquido.

A criolesão, no grupo-experimental, foi mais localizada e cicatrizou mais precocemente. Uma regeneração mais rápida é especialmente importante no tratamento de lesões da cavidade bucal e próximas a estruturas nobres, com os nervos periféricos, pois acelera o processo de cicatrização e diminuindo a morbidade do tratamento.

As variáveis avaliadas, macro e microscopicamente, não demonstraram diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos avaliados no período de duração do experimento. A metodologia empregada ou os parâmetros utilizados nas avaliações, bem como o teste estatístico aplicado para a análise dos dados, podem não ter sido suficientemente sensíveis para detectar mínimas variações entre os grupos e, talvez, por isso não se tenham encontrado diferenças significativas. Contudo, pode-se afirmar que os dois tratamentos utilizados foram equivalentes ou iguais.

Através da análise dos resultados obtidos e sua comparação com a literatura, comprova-se a importância desta pesquisa para evolução da criocirurgia. Embora haja muitos trabalhos publicados ao longo de cinco décadas, nenhum estudo foi realizado com o uso do gás refrigerante propano-butano. Outro gás refrigerante, o tetrafluoretano, já utilizado para tratar lesões da cavidade bucal, porém de modo empírico e com protocolos não padronizados, baseados apenas na experiência clínica dos autores (MENDONÇA et al., 2011; KUMAR et al., 2012; SINGH et al., 2012; KUMAR et al., 2013).

Portanto, os achados clínicos e histológicos deste estudo são de grande relevância, pois, a partir deste experimento, o gás refrigerante propano-butano pode ser utilizado com maior segurança na clínica odontológica. Este trabalho confirma a experiência clínica de outros pesquisadores, porém, agora, baseado em evidências científicas. Abre-se um campo inexplorado para novos protocolos e tratamentos para as diversas lesões da cavidade bucal. Ampliam-se também as opções de criógenos. Devido aos baixos custos e disponibilidade do material, facilita-se o acesso do cirurgião-dentista à técnica de criocirurgia. Com isso, muitos pacientes podem ser beneficiados. Contudo, mais estudos são necessários para avaliar os efeitos do gás refrigerante propano-butano nos diversos tecidos e nas diversas lesões patológicas da cavidade bucal.

7 CONCLUSÕES

Através da análise comparativa dos resultados desta pesquisa, pode-se concluir que:

- As variáveis avaliadas, macro e microscopicamente, não demonstraram diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos avaliados, nos períodos de 1, 3, 7, 14 e 21 dias. Desta forma, pode-se afirmar que Endo-Frost® e o nitrogênio líquido apresentaram resultados iguais ou equivalentes;
- Clinicamente, o grupo tratado com gás refrigerante propano-butano apresentou uma cicatrização mais precoce, completando-se com 14 dias. No grupo-controle a cicatrização completa só ocorreu com 21 dias;
- Histologicamente todos os critérios morfológicos avaliados estavam ausentes no 21º dia. O coágulo não foi detectado em nenhum período do experimento;
- A resposta inflamatória foi aguda, intensa e de maior extensão no 1º e 3º dia. O 7º dia foi marcado por um período de transição dos critérios. No 21º dia de cicatrização, predominou um processo inflamatório crônico e leve;
- Os dois protocolos de crioterapia utilizados foram capazes de congelar a mucosa bucal, produzindo crionecrose. Entretanto, Endo-Frost® causou menor morbidade e o edema foi menos intenso. Além destas vantagens, este criógeno tem baixo custo, é um produto multiuso e é de fácil acesso ao cirurgião-dentista. Contudo, novos estudos são necessários para aprimoramento da técnica nas diversas lesões da cavidade bucal.

REFERÊNCIAS¹

Ahmed I, Agarwal S, Ilchyshyn A, Charles-Holmes S, Berth-Jones J. Liquid nitrogen cryotherapy of common warts: cryo-spray vs cotton wool bud. *Br J Dermatol*. 2001; 144(5):1006-9.

Bansal A, Jain S, Gupta S. Cryosurgery in the treatment of oro-facial lesions. *Indian J Dent Res*. 2012; 23(2):297-302.

Barbosa JF, Sanvitto LC. Crioterapia local (criocirurgia): denominação e histórico. *Boletim de Oncologia*. 1973; 3(3):29-34.

Barnard, D. The effects of extreme cold on sensory nerves. *Annals of the Royal College of Surgeons of England*. 1980; 62(3):180-7.

Beltrão RG. Análise clínica dos efeitos do nitrogênio líquido aplicado com hastes de algodão em lábio e palato de coelhos [Dissertação de mestrado]. Porto Alegre: Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2003.

Borges HOI. Uso clínico de crioterapia com nitrogênio líquido no tratamento de hiperplasia bucal [Dissertação de mestrado] Porto Alegre: Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; 2005.

Bublitz LS, Collares; Orlandi K. Avaliação dos efeitos da crioterapia com nitrogênio líquido em Lesões hiperplásicas bucais. In: XIX CIC da UFPel. Anais; 2010 nov 9-12; Pelotas, Brasil. Rio Grande do Sul: XIX CIC; 2010. p.82.

Buch B, Papert AI, Shear M. Microscopic changes in rat tongue following experimental cryosurgery. *J Oral Pathol.* 1979; 8(2):94-102.

Cerqueira A, Sant'ana-Filho M. Margem de segurança com crioterapia após curetagem de lesões recidivantes maxilomandibulares: relato de caso. *Rev Bras Cir Implantodont.* 2001; 8(31):193-6.

Costa FWG, Pessoa RMA, Nogueira CBP, Pereira KMA, Brito GAC, Soares ECS. Changes in morphology of long bone marrow tissue of rats submitted to cryotherapy with liquid nitrogen. *Acta Cir Bras.* 2012; 27(2):179-84.

Costa FWG, Soares ECS, Batista SHB. Criocirurgia no tratamento de lesões benignas dos maxilares: revisão de literatura e análise de 103 casos previamente Reportados. *Rev Sul-Bras Odontol.* 2010;7(2):208-15.

Emmings FG, Koepf SW, Gage AA. Cryotherapy for benign lesions of the oral cavity. *J Oral Surgery.* 1967; 25(4):320-6.

Fernandes MMS, Etges A, Torriani M. O Uso da Crioterapia com Nitrogênio Líquido em Lesões Intra-Ósseas dos Maxilares. *Rev Bras Cir Traumatol Buco-maxilo-fac.* 2010;10(2):49-57.

Gage AA. Experimental cryogenic injury of the palate: observation pertinent to cryosurgical destruction of tumors. *Cryobiology.* 1978;15(4):415-25.

Gage AA. History of cryosurgery. *Semin Surg Oncol.* 1998;14(2):99-109.

Gage AA, Baust J . Mechanisms of tissue injury in cryosurgery. *Cryobiology*. 1998; 37:171-86.

Gage AA, Baust JM, Baust JG. Experimental Cryosurgery Investigations In Vivo *Cryobiology*. 2009; 59(3): 229-43.

Getter L, Perez B. Controlled cryotherapy in the treatment of inflammatory papillary hyperplasia. *Oral Surgery*. 1972;34(2):178-86.

Gongloff RK, Gage AA. Cryosurgical treatment of oral lesions: report of cases. *J Am Dent Assoc*. 1983;106(1):47-51.

Gongloff RK, Samit AM, Greene GW, Inneo GF, Gage AA. Cryosurgical management of benign and dysplastic intraoral lesions. *J Oral Surg*. 1980;38(9):671-6.

Grimmett RH. Liquid nitrogen therapy. *Arch Dermatol*. 1961; 83(4):563-7.

Hausamen JE. The basis technique and indication for cryosurgery in tumors of the oral cavity and face. *J Oral Surg*. 1975; 33(7):546-7.

Hoffmann NE, Bischof JC. The cryobiology of cryosurgical injury. *Urology*. 2002;60(2): 40-9.

Hurt WC, Nabers CL, Rose GG. Some clinical and histologic observations of gingiva treated by cryotherapy. *J Periodont.* 1972; 43(3):151-6.

Ishida CE. Criocirurgia. In: Kadunc B, Palermo E, Addorf F, Metsavaht L, Rabello L, Mattos R, Martins S. *Tratado de cirurgia dermatológica, cosmiatria e laser: da Sociedade Brasileira de Dermatologia.* Rio de Janeiro: Elsevier; 2013. p.537-554.

Ishida CE, Ramos-e-Silva M. Cryosurgery in oral lesions. *Int J Dermatol.* 1998; 37(4):283-5.

Jarzab G. Clinical experience in the cryosurgery of hemangioma. *J Maxillof Surg.* 1975; 3(3):146-9.

Krashen AS. Cryotherapy of herpes of the mouth. *J Am Dent Assoc.* 1970; 81:1163-5.

Kumar S, Bhatb GS, Bhat KM. Development in techniques for gingival depigmentation: an update. *Indian J Dentist.* 2012;3(4): 213-21.

Kumar S, Bhat GS, Bhat KM. Effectiveness of cryogen tetrafluoroethane on elimination of gingival epithelium and its clinical application in gingival depigmentation-histological findings and case series *J Clin Diagn Res.* 2013;7(12)3070-2.

Lemos-Júnior CA. *Criocirurgia em lesões benignas da mucosa bucal: revisão da literatura e sua avaliação clínica em 37 casos [Dissertação de mestrado].* São Paulo: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, 1999.

Leopard PJ, Poswillo DE. Practical cryosurgery for oral lesions. *Br Dent J* 1974; 136(5):185-96.

Leopard PJ. Cryosurgery and its application to oral surgery. *Br J Oral Surg.* 1975; 13(2): 128-152.

Li ZY. Cryosurgery in 50 cases of tongue carcinoma. *J Oral Maxillofac Surg.* 1991; 49(5): 504-6.

Maccini M, Sehr D, Pompeo A, Chicoli FA, Molina WR, Fernando, Kim FJ. Biophysiologic Considerations in Cryoablation: A Practical Mechanistic Molecular Review. *Int Braz J Urol.* 2011;37(6):693-6.

Marciani RD, Trodahl JM. Postoperative sequelae of cryosurgery. *J Oral Surg.* 1975; 33(6):458-61.

Marcushamer M, King DL, Ruano NS. Cryosurgery in the management of mucoceles in children. *Pediatr Dent.* 1997;19(4): 292-3.

Mendonça JCG, Santos AA, Lopes HB. Hemimaxilectomia associada à crioterapia no tratamento de ameloblastoma: relato de caso. *Rev Bras Cir Craniomaxilofac.* 2011; 14(1): 63-6.

Moraes NP, Biazolla, ER. Crioterapia para tratamento de papilomatose subplaca: estudo clínico em humanos. *Rev Bras Odontol.* 1997;54(2):84-7.

Moura-Netto C, Yamazaki AK, Cardoso LN, Cabrales RJS, Prokopowitsch. Avaliação da temperatura mínima alcançada por cinco gases refrigerantes. Rev Inst Ciênc Saúde. 2007; 25(4):403-5.

Nishida H, Yamamoto N, Tanzawa Y, Tsuchiya H. Cryoimmunology for malignant bone and soft-tissue tumors. Int J Clin Oncol. 2011;16(2): 109-17.

Pogrel MA. The use of liquid nitrogen cryotherapy in management of locally aggressive bone lesion. J Oral Maxillofac Surg. 1993; 51(3):269-73.

Pogrel MA, Yen CK, Taylor R. A study of infrared thermographic assessment of liquid nitrogen cryotherapy. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1996;81(4):396-401.

Poswillo DE. Applications of cryosurgery in dentistry. Dent Update. 1978; 5(1):27-30.

Poswillo DE. Cryosurgery of benign oral and orofacial lesions. In: Bradley PF. Cryosurgery of the Maxillofacial Region: General Principles and Clinical Application to Benign Lesions. Flórida: CRC Press, Boca Raton; 1986. p. 153-75.

Prasad M, Kale TP, Halli R, Kotrashetti SM, Baliga SD. Liquid nitrogen cryotherapy in the management of oral lesions: a retrospective clinical study. J Maxillofac Oral Surg. 2009 8(1):40-2.

Reade PC. Cryosurgery in clinical dental practice. Int Dent J. 1979;29(1)1-11.

Ribeiro AS, Abreu MHNG, Aparecida-Silva T, Mesquita RA. The Use of Cryosurgery in Treatment of the Gingival Leukoplakia: Report of a Case Series. *Inter J Oral Maxillofac Pathol.* 2012;3(1):28-33.

Sako K, Marchetta FC, Hayes RL. Cryotherapy of intraoral leucoplakia. *Am J Surg.* 1972; 124(4):481-3.

Santos AMB, Sant'ana-Filho M. Análise morfológica do efeito de diferentes protocolos de nitrogênio líquido sobre a mucosa bucal: estudo em ratos. *Rev Fac. Odontol.* 2002; 43(2): 18-23.

Scortegagna A. Sant'Ana-Filho M. Análise microscópica de enxerto ósseo autógeno em mandíbula de coelhos submetida à crioterapia com nitrogênio líquido. *Rev odonto ciênc.* 2004; 19(46): 332-337.

Schmidt BL; Pogrel MA. Neurosensory changes after liquid nitrogen cryotherapy. *J Oral Maxillofac Surg.* 2004;62(10):1183-7.

Schmidt BL, Pogrel MA. The use of enucleation and liquid nitrogen cryotherapy in the management of odontogenic keratocysts. *J Oral Maxillofac Surg.* 2001;59:720-5.

Schmelzeisen R, Stauch G, Hessel S. Effects of Nd-YAG laser and cryosurgery on the oral mucosa in rabbits. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 1989;18(2):114-6.

Shirani AM. Cryosurgery (N₂O) Application to Remove Lip Lesions of Lipoid Proteinosis Syndrome: A Case Report. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects.* 2008;2(2):68–70.

Singh V, Giliyar SB, Kumar S, Bhat M. Comparative Evaluation of Gingival Depigmentation by Diode Laser and Cryosurgery Using Tetrafluoroethane: 18-Month Follow-Up. *Clinical Advances in Periodontics*. 2012;2(3):129-34.

Silva FM. Estudo das características histológicas do processo de reparo após aplicação de nitrogênio líquido em tecido ósseo em mandíbulas de coelho [Tese de Doutorado]. Porto Alegre: Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2003.

Tal H, Cohen MA, Lemmer J. Clinical and histological changes following cryotherapy in a case of widespread oral leukoplakia. *Int J Oral Surg*. 1982;11(1): 64-8.

Tal H. Cryosurgical treatment of hemangiomas of the lip. *Oral Surg Oral Med oral pathol*. 1992; 73(6):650-4.

Tal H, Gorsky M. Cryosurgical treatment of a buccal varix. *J Oral Med*. 1987;42(1):63-5.

Tal H, Landsberg J, Kozlovsky A. Cryosurgical depigmentation of the gingiva: a case report. *J Clin Periodontol*. 1987; 14(10): 614-17.

Tal H. The rationale and technique of cryotherapy of superficial oral lesions. *J Dent Assoc of South Africa*. 1982; 37(5)335-40.

Thai K-E, Sinclair R. Cryosurgery of benign skin lesions. *Australas J Dermatol.* 1999; 40: 175-86.

Toida M, Ishimaru JI, Hobo N. A simple cryosurgical method for treatment of oral mucous cysts. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 1993; 22(6): 353-5.

Turjansky E, Stolar E. Criocirurgía en lesiones de boca. *Rev Asoc Med Argent.* 1992; 105(5): 22-6.

Valente FS. Terapia tópica na cicatrização de lesões cutâneas provocadas por congelamento com nitrogênio líquido em ratos Wistar [Tese de Mestrado]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Faculdade de Veterinária, 2014.

Vyasarayani P; Madhumietha A; Gundlapalle P. Management of geriatric patient with epulis fissuratum using liquid nitrogen cryosurgery: a case report. *J Indian Prosthodont Soc.* 2014; 14(1):115-9.

Whittaker DK. Early cellular changes following cryosurgery of oral mucosa in hamsters. *J Oral Pathol.* 1980;9(4): 235-45.

Whittaker, DK. History of Cryosurgery. In: Bradley PF. *Cryosurgery of the Maxillofacial Region.* CRC Press.1986; 1: 1-15.

Whittaker DK. Mechanisms of tissue destruction following cryosurgery. *Ann R Coll Surg Engl.* 1984;66(5): 313-8.

Yeh CJ. Simple cryosurgical treatment for oral lesions. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2000;29(3):212-6.

Zimmerman EE, Crawford P. Cutaneous cryosurgery. *Am Fam Physician.* 2012; 86(12): 1118-24.

APÊNDICE A – Foto ilustrativa do criocautério Nitrospray® de 350 ml

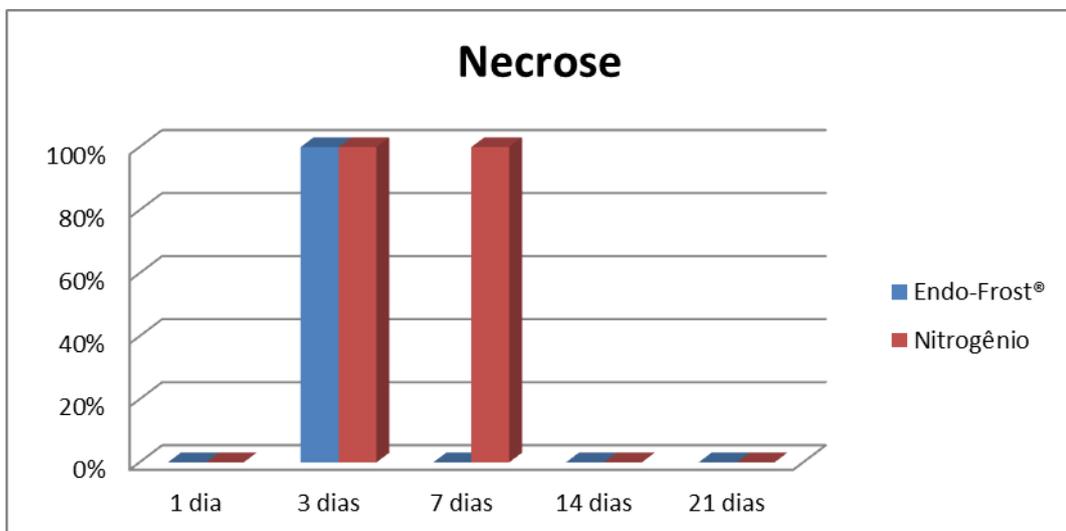
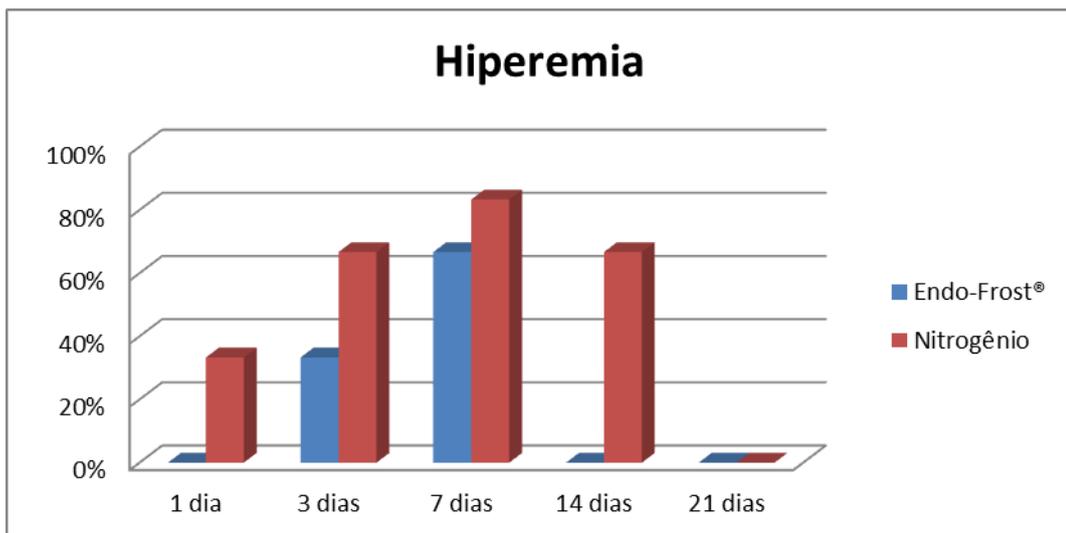
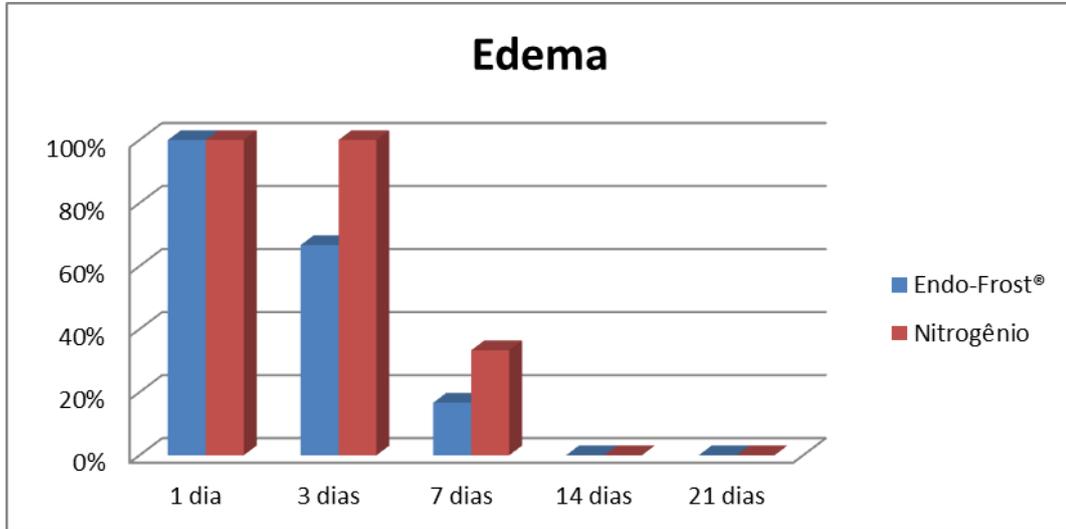


Ponteira de 0,7 mm (A), gatilho (B), ampola isolante (C), kit de ponteiros abertos ou de *spray* (D), ponteiros fechados ou de contato (E), tampa (F) e válvula de segurança (G).

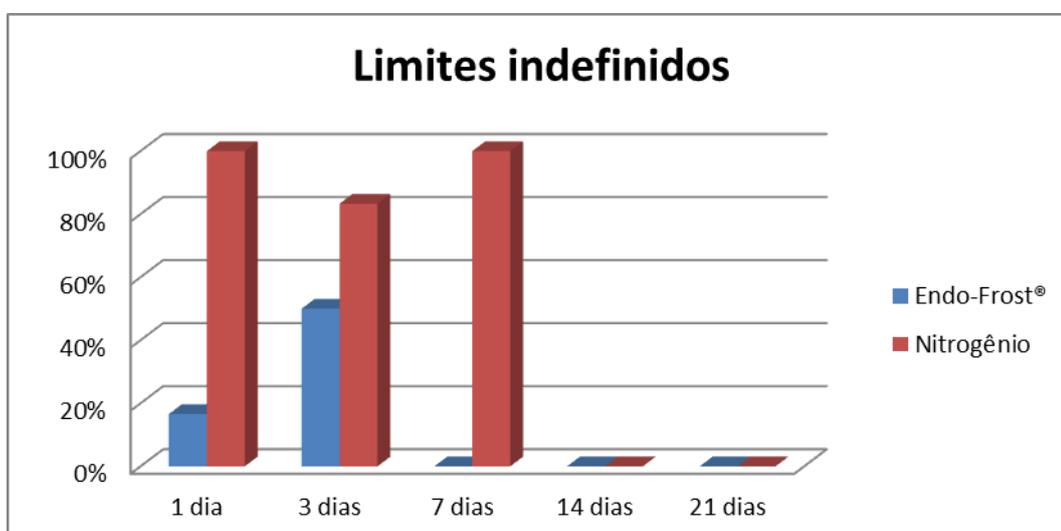
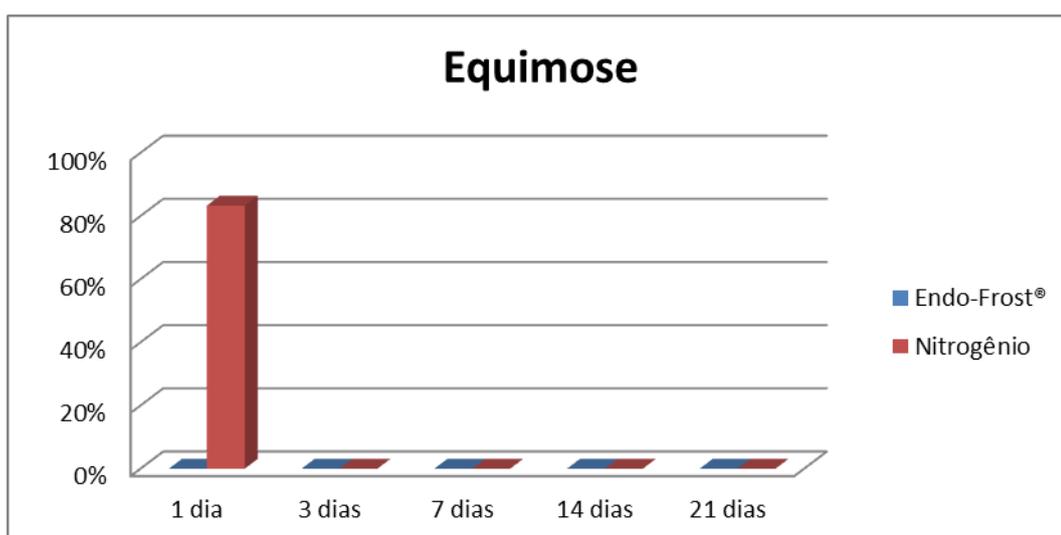
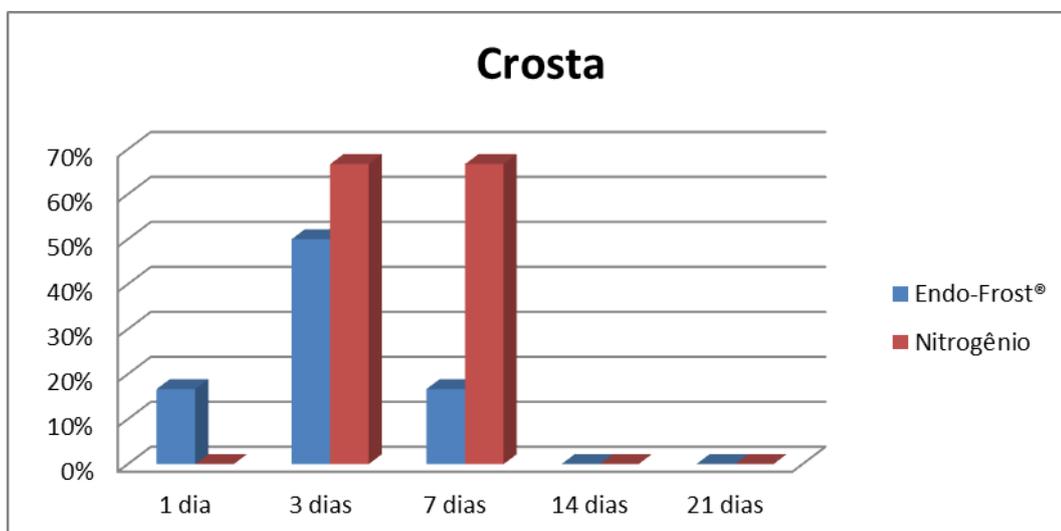
APÊNDICE B – Foto ilustrativa do Endo-Frost® de 200 ml com cânula de aplicação



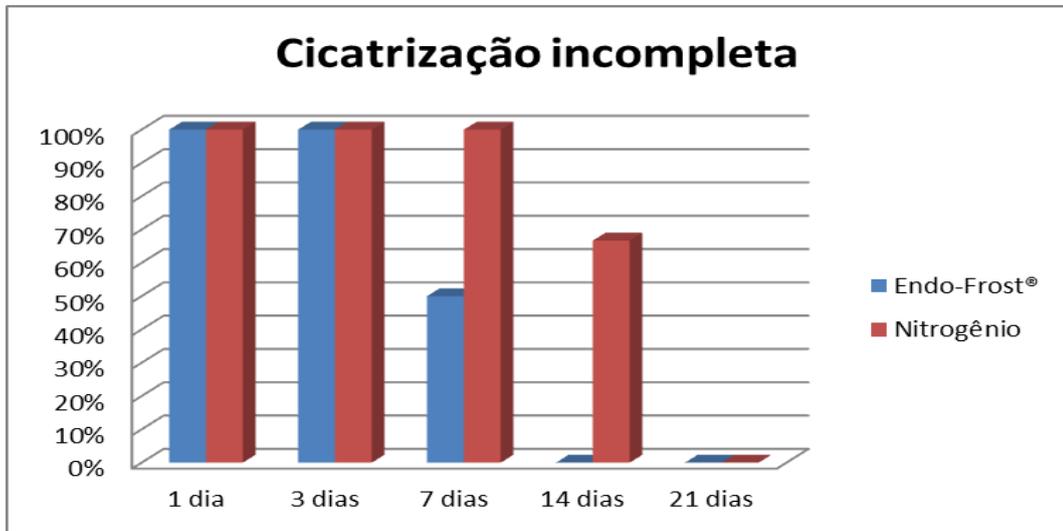
APÊNDICE F – Gráfico individual do edema, hiperemia e necrose (parâmetros clínicos)



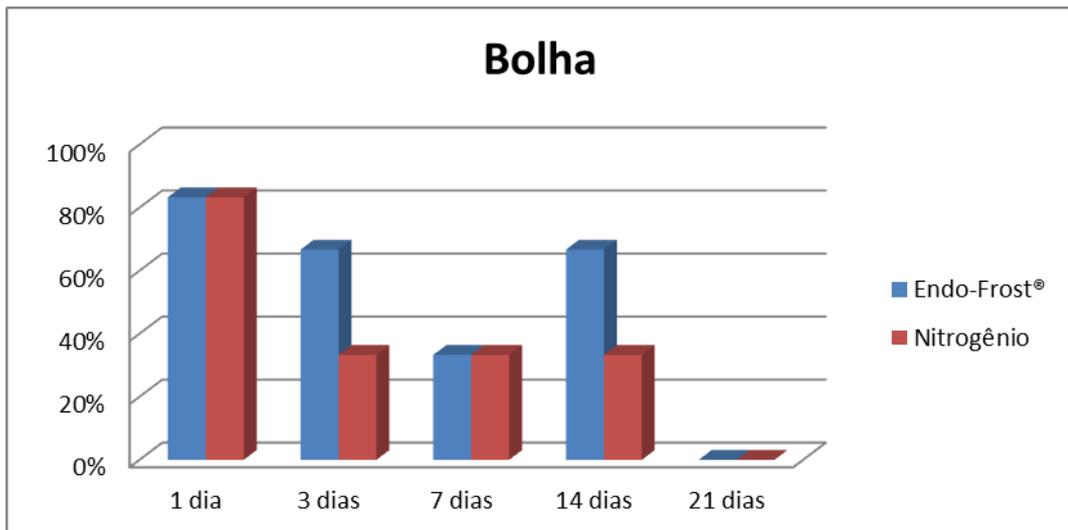
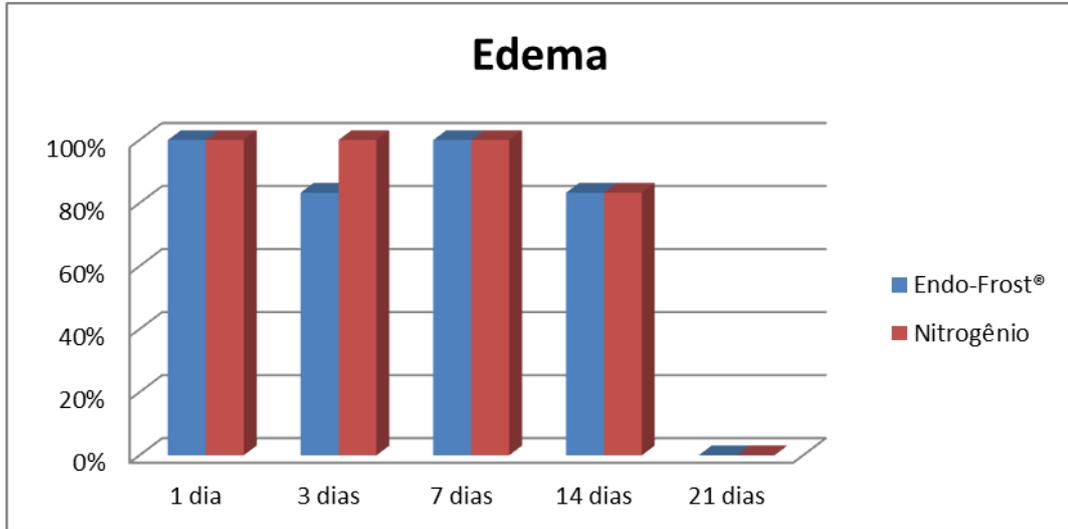
APÊNDICE G – Gráfico individual da crosta, equimose e limites indefinidos (parâmetros clínicos)



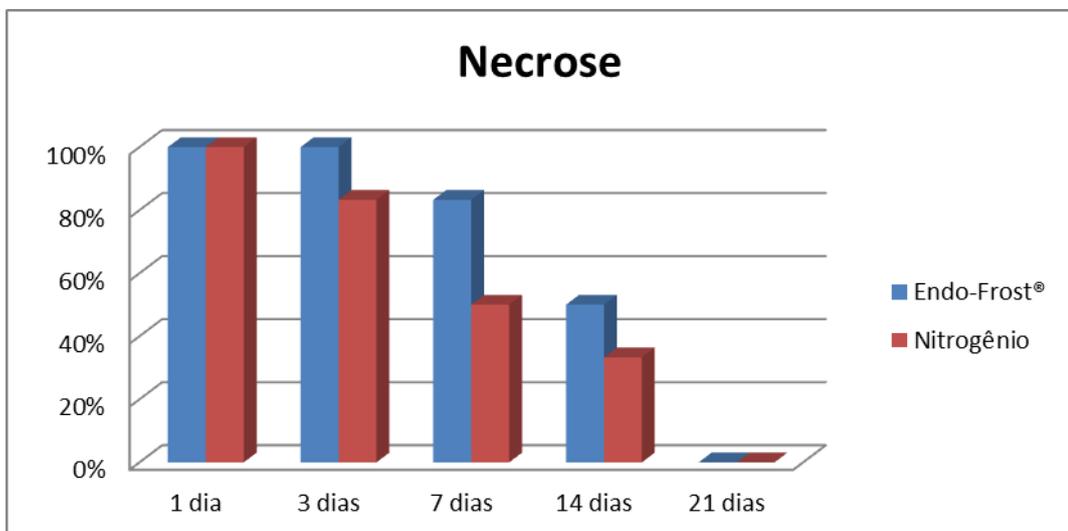
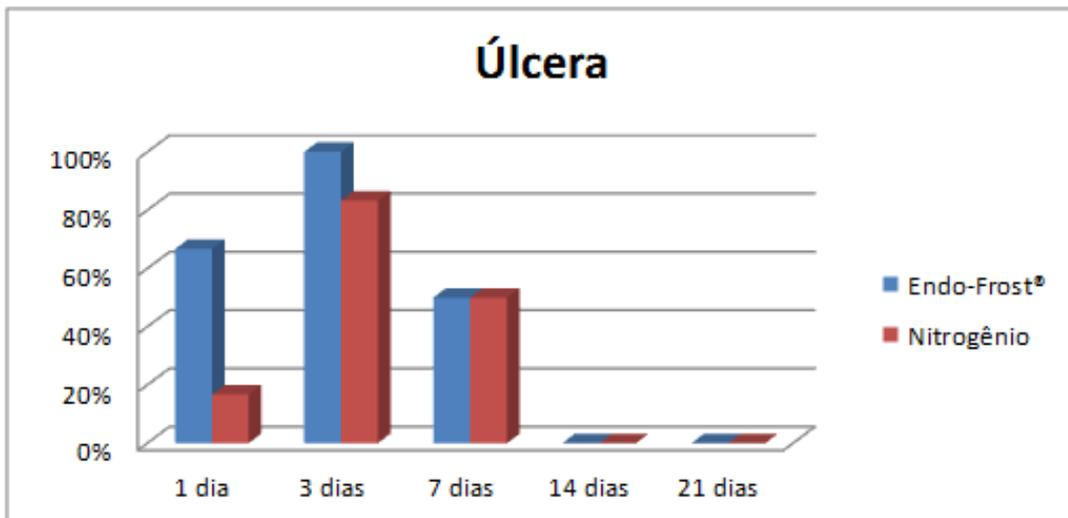
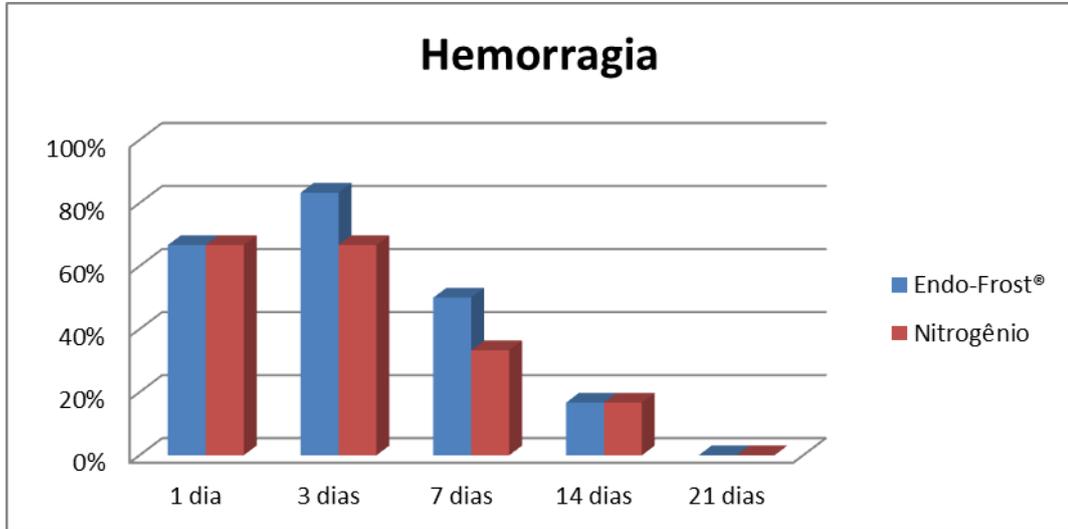
APÊNDICE H – Gráfico individual da cicatrização incompleta (parâmetros clínicos)



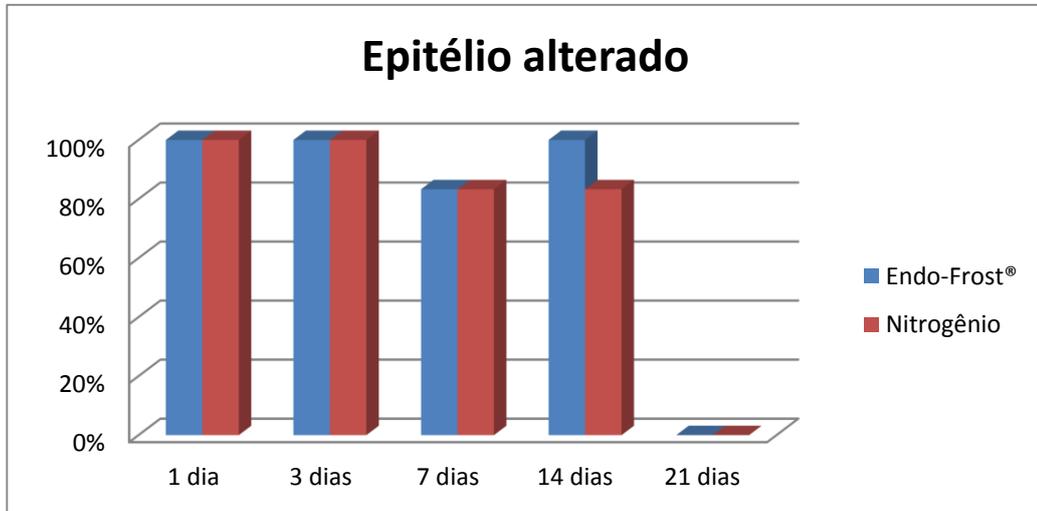
APÊNDICE I – Gráfico individual do edema, bolha e desestruturação epitêlio (parâmetros histológicos)



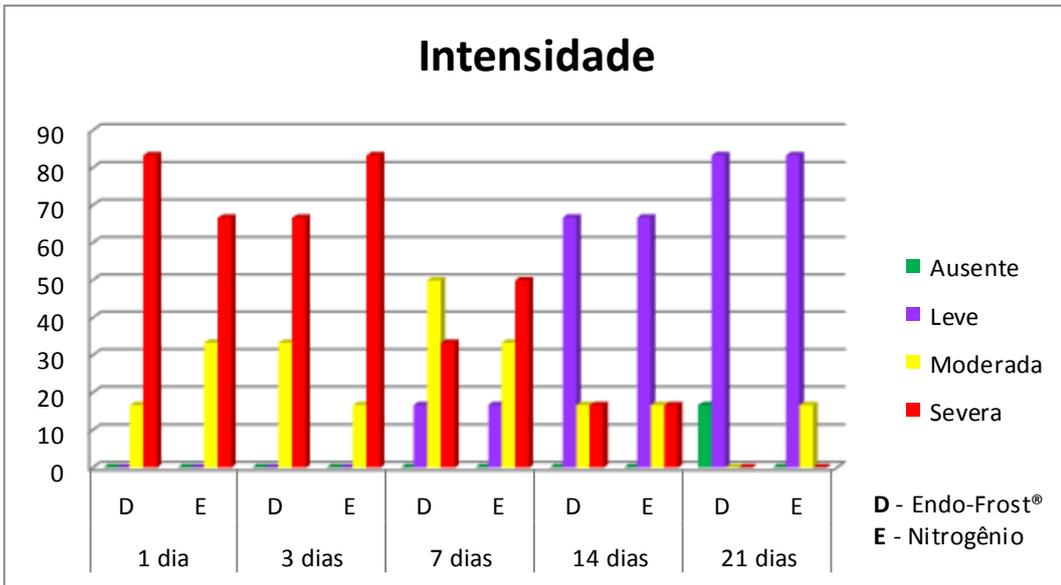
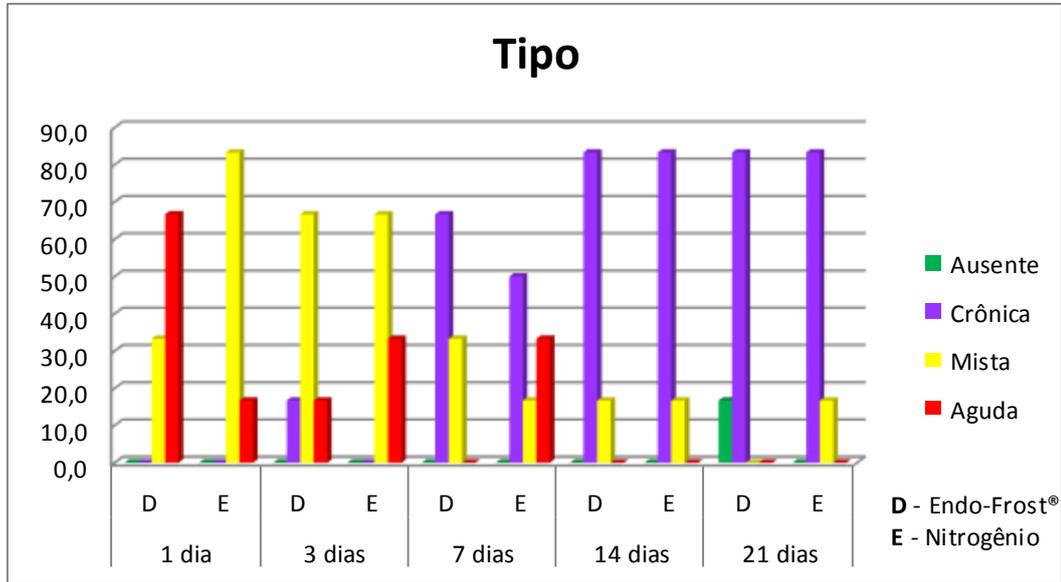
APÊNDICE J – Gráfico individual da hemorragia, úlcera e necrose (parâmetros histológicos)



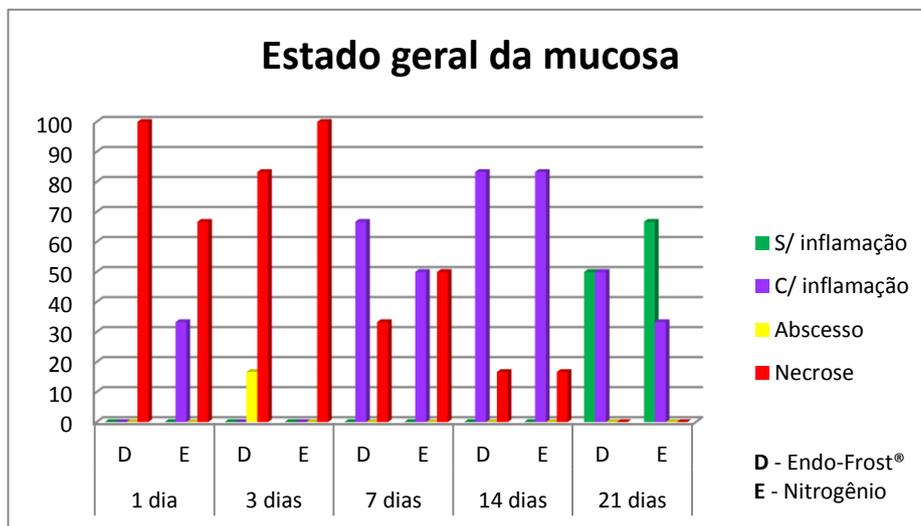
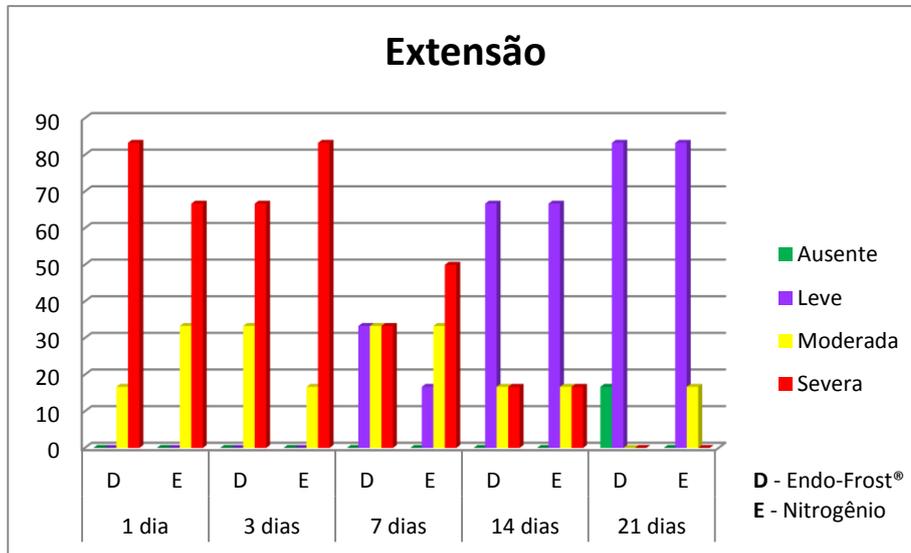
APÊNDICE K – Gráfico individual do epitélio alterado (parâmetros histológicos)



APÊNDICE L – Gráfico da resposta inflamatória (parâmetros histológicos)



APÊNDICE M – Gráfico da resposta inflamatória (parâmetros histológicos)



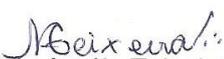
ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética



Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Comissão de Ética no Uso de Animais /CEUA

C E R T I F I C A D O

Certificamos que o Protocolo nº 578/2013 do Pesquisador Jose Carlos Garcia de Mendonça , referente ao projeto de pesquisa “Estudo morfológico comparativo da crioterapia com nitrogênio líquido e gás refrigerante propano-butano na mucosa oral de ratos”, está de acordo com os princípios éticos adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), com a legislação vigente e demais disposições da ética em investigação que envolvem diretamente os animais e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA/UFMS, em reunião extraordinária do dia 22 de janeiro de 2014.


Maria Araújo Teixeira

Coordenadora da CEUA/UFMS

Campo Grande, 22 de janeiro - 2014.

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA
<http://www.propp.ufms.br/ceua>
ceua@propp.ufms.br
fone (67) 3345-7184