

Lilian Mayumi Odo

**Estudo comparativo da pele pré e pós-laser fracionado
minimamente ablativo com Erbium-YAG de 2940nm para
tratamento de ríntides da região perioral : avaliação clínica,
anátomo-patológica e imuno-histoquímica**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo, para obtenção do
título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Dermatologia
Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Cucé

São Paulo

2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Odo, Lilian Mayumi

Estudo comparativo da pele pré e pós-laser fracionado minimamente ablativo com Erbium-YAG de 2940nm para tratamento de ríides da região perioral : avaliação clínica,anátomo-patológica e imuno-histoquímica / Lilian Mayumi Odo. -- São Paulo, 2010.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Departamento de Dermatologia.

Área de concentração: Dermatologia.

Orientador: Luiz Carlos Cucé.

Descritores: 1.Envelhecimento da pele 2.Pele 3.Fototerapia 4.Laser
i5.Imunoistoquímica 6.Receptores *Toll-like* 7.Células de Langerhans

USP/FM/SBD-036/10

“Um fator precioso para o ser humano é a disposição de estudar e aprender, ato este muito mais importante do que o de obter fama e riqueza. Por mais que uma pessoa seja famosa, ela não é digna de respeito se não possui essa disposição. Continuar estudando ao longo do curso da vida – eis a atitude de uma pessoa respeitável”

Daisaku Ikeda (filósofo budista)

Dedicatória

Aos meus pais Marina e Alcides, declaro minha eterna gratidão,
Às minhas irmãs Luciana e Letícia,
E aos meus lindos sobrinhos Estele e Lucas,
vocês formam o alicerce da felicidade de toda minha vida.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos Cucé, meu pai e mestre na dermatologia, por me orientar nessa obra e em toda minha carreira dermatológica até o momento.

À Profa. Dra. Mírian N. Sotto, que pela sua sabedoria e experiência na pós-graduação iluminou meu caminho até a concretização desse sonho.

Aos professores, Dra. Neusa Y. S. Valente e Dr. Jayme de Oliveira Filho, pelas valiosas e bem qualificadas dicas de melhoria dessa tese.

Ao Prof. Dr. Heitor Franco de Andrade Jr. pelas análises dos resultados estatisticamente significativas.

Ao Dr. Luiz Fernando Ferraz da Silva (Burns), que pela sua perícia em morfometria proporcionou grandes dimensões à esse trabalho.

À querida Fernanda Guedes pelo árduo e minucioso trabalho nas reações de imunohistoquímica.

Ao amigo Wellington Luiz Ferreira da Silva por me guiar pelo interessante mundo do Image Pro-plus, sempre pronto para me ajudar.

Ao trio fantástico, Maria Cristina Galhardo, Jacqueline M. C. Aragão, Luciana F. Cassimiro pela preciosa elaboração das lâminas de anátomo-patologia.

Aos doutores Sérgio Schalka e Régia Patriota pelo compartilhamento de conhecimentos práticos para a realização do mestrado.

À professora Mércia Maria Arruda pela eficiência e rapidez na revisão da língua portuguesa.

Ao simpático Josué pela artística finalização gráfica dessa tese.

À dermatologia da UNISA por ter me acolhido calorosamente como parte integrante dessa grande família.

À toda equipe das Clínicas ODO que pela atenção dedicada e firme aos meus pacientes me deu tranquilidade de espírito nas minhas ausências decorrentes da pós-graduação.

Aos meus amados familiares e amigos pelas palavras carinhosas de incentivo e torcida para o sucesso desse trabalho. Mesmo que as circunstâncias da vida mudem, a verdadeira amizade permanece inabalável!

Aos meus pacientes pela confiança em mim depositada, vocês são a fonte de inspiração da minha constante busca pelo aperfeiçoamento profissional e humano, na tentativa de fazer alguma diferença positiva mesmo que seja nesse meu micro-cosmo.

Sumário

Lista de Abreviaturas

Lista de Tabelas

Lista de Figuras

Resumo

Summary

1	Introdução	1
2	Objetivos	5
3	Revisão da literatura	7
3.1	Fototermólise fracionada.....	8
3.2	Envelhecimento da região perioral.....	13
3.3	Mecanismos de defesa da pele	15
4	Método	29
4.1	Casuística	30
4.2	Método	31
5	Resultados	58
5.1	Evolução anátomo-patológica pós-laser	61
5.2	Resultado estatístico.....	65
5.3	Evolução clínica pós-laser	71
5.4	Resultados clínicos	72
6	Discussão.....	85
7	Conclusão	101
8	Anexos	105
9	Referências	123

Lista de abreviaturas

C3:	fração do complemento 3
CCL2:	CC quimiocina ligante 2
CCL20:	CC quimiocina ligante 20
CD:	<i>cluster of differentiation</i> (grupamento de diferenciação)
cm:	centímetros
cm ² :	centímetro quadrado
CO ₂ :	dióxido de carbono
col.:	colaboradores
CpG:	citosina fosfato guanina
CXCL12:	CXC quimiocina ligante 12
CYP27B1:	citocromo P450, família 27, subfamília B, polipeptídeo 1
DNA:	ácido desoxirribonucléico
DOPA:	dihidroxifenilalanina
dsRNA:	ácido ribonucléico de cadeia dupla
et al.:	e outros
ex.:	exemplo
Fc Ig:	fração Fc da imunoglobulina
GAIS:	<i>global aesthetic improvement scale</i> (melhora estética global)
GM-CSF:	fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos
G-:	Gram negativo
G+:	Gram positivo
H/E:	hematoxilina/eosina
HLA:	antígeno leucocitário humano
HMGB1:	<i>high-mobility group box 1</i> (caixa do grupo de alta mobilidade 1)
HSP:	<i>heat shock protein</i> (proteína de choque térmico)
HSV:	herpes simples virus
Hz:	<i>hertz</i>
ICAM:	molécula de adesão intercelular
IL:	interleucina
INF:	<i>interferon</i> (interferão)
LAG:	leucoaglutinina
LFA:	antígeno associado à função leucocitária

MAP-kinase:	cinase de proteínas ativada por agentes mitogênicos
MHC:	complexo principal de histocompatibilidade
mj / cm ² :	milijoules por centímetro quadrado
µm:	micrômetro
mm ² :	milímetro quadrado
MMP:	metaloproteinases
ms:	milissegundos
My88:	fator de diferenciação mielóide 88
NF-κB:	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i> (fator nuclear de transcrição <i>kappa B</i>)
NK:	células assassinas naturais
nm:	nanômetros
Nº:	número
NO:	óxido nítrico
PBS:	<i>phosphate buffered saline</i> (tampão fosfato salina)
pH:	potencial hidrogênio iônico
PO:	pós operatório
RNA:	ácido ribonucléico
S100:	proteína S100
SARM:	<i>sterile α and armadillo motifs</i> (alfa estéril /motivo tatu)
ssRNA:	ácido ribonucléico de cadeia simples
T200:	glicoproteína de membrana leucócito específica
TGF:	fator de crescimento transformante
Th:	células T auxiliares/indutoras
TIR:	domínio intracelular homólogo ao do <i>Toll</i> /receptor de IL-1
TIRAP:	<i>toll-interleukin 1 receptor domain containing adaptor protein</i> (proteína adaptadora contendo um domínio TIR)
TLR:	receptores <i>toll-like</i>
TNF:	fator de necrose tumoral
TRAM:	<i>Trif-related adaptor molecule</i> (molécula adaptadora relacionada com TRIF)
TRIF:	<i>Toll receptor-associated activator of interferon</i> (proteína adaptadora contendo um domínio TIR e indutora do IFN-β)
TRIS-EDTA:	trisaminometano-etilenodiaminotetra-acético
UV:	ultravioleta
YAG:	<i>yttrium aluminium garnet</i> (cristal de ítrio e alumínio)

Lista de Tabelas

Tabela 1 - TLR e suas características	22
Tabela 2 - Expressão dos TLRs nas células cutâneas (49, 50).....	24
Tabela 3 - Classificação de Baker para rugas estáticas	41
Tabela 4 - Escala de melhora estética global (GAIS).....	42
Tabela 5 - Valores de CD1a, TLRs 2, 3 e 9 pré e pós-tratamento.....	66
Tabela 6 - Valores da média e desvio padrão de fibras colágenas pré e pós tratamento.....	69
Tabela 7 - Classificação de Baker para rugas pré e após 28 dias do tratamento	79
Tabela 8 - Classificação da intensidade de melhora das rugas periorais após 28 dias do laser.....	80
Tabela 9 - Incidência dos efeitos colaterais segundo tempo de evolução pós- laser	84

Lista de Figuras

Figura 1 - Pele intacta ao redor dos pixels é fonte de células potentes que promovem rápida cicatrização das áreas fotodanificadas.	10
Figura 2 - Cicatrização das áreas fotodanificadas em progressão.	10
Figura 3 - Completa cicatrização da pele.	10
Figura 4 - Fracionamento do raio laser em microrraios (a). Cada microrraio forma colunas de lesões térmicas na epiderme e derme (b), deixando pontos carimbados na pele chamados de pixels (c).....	32
Figura 5 - Dois padrões de tratamento possíveis: 49 ou 81 pixels, em área constante de 11mm ²	33
Figura 6 - Características da lesão térmica cutânea de acordo com o número de passadas.....	34
Figura 7 - Relação do Número (Nº) de pulsos estacionários com a profundidade da lesão térmica cutânea em microns.....	35
Figura 8 - Escala visual de faces de Wong-Baker para dor	40
Figura 9 - Imagem da coloração de Picrosírius através da luz polarizada. Aumento 400x	48
Figura 10 - Delimitação em verde da área a ser analisada, correspondente a derme superior. Aumento 400x.....	50
Figura 11 - Fibras grossas vermelho-alaranjadas (colágeno tipo I) destacadas em azul. Área total das fibras é calculada automaticamente pelo programa em µm ² (seta). Aumento 400x.....	50
Figura 12 - Fibras finas verdes (colágeno tipo III) destacadas em azul. Área total das fibras é calculada automaticamente pelo programa em µm ² (seta). Aumento 400x.....	51
Figura 13 - Cálculo automático em µm ² da área total analisada destacada em vermelho (seta). Aumento 400x.....	51
Figura 14 - Delimitação de toda epiderme (em verde) para ser analisada. Células de Langerhans coradas em marrom pela imuno-histoquímica (seta). Aumento 200x.....	53
Figura 15 - Células de Langerhans destacadas em vermelho para o cálculo da sua área total em µm ² (seta). Aumento 200x.....	53
Figura 16 - Cálculo da área total da epiderme analisada em µm ² (seta). Aumento 200x.....	54
Figura 17 - Imuno-histoquímica para TLR 2 com expressão na epiderme destacada em vermelho (seta). Aumento 200x.....	55
Figura 18 - Imuno-histoquímica para TLR 9 com expressão na epiderme destacada em vermelho (seta). Aumento 200x.....	55

Figura 19 - Imuno-histoquímica para TLR 3 com expressão na epiderme destacada em vermelho (seta). Aumento 200x.....	55
Figura 20 - Corte histológico da pele após 3 dias do tratamento com laser (H/E aumento 200x).....	61
Figura 21 - Corte histológico da pele após 7 dias do tratamento com laser (H/E aumento 200x).....	62
Figura 22 - Corte histológico de pele após 14 dias do tratamento com laser (H/E aumento 200x).....	63
Figura 23 - Corte histológico de pele controle pré-tratamento (H/E aumento 200x)	64
Figura 24 - Corte histológico de pele após 28 dias do tratamento com laser (H/E aumento 200x).....	65
Figura 25 - Evolução clínica da pele perioral após o laser	71
Figura 26 - Região perioral da paciente 01 pré e após 28 dias do tratamento	72
Figura 27 - Região perioral da paciente 02 pré e após 28 dias do tratamento	72
Figura 28 - Região perioral da paciente 03 pré e após 28 dias do tratamento	73
Figura 29 - Região perioral da paciente 04 pré e após 28 dias do tratamento	73
Figura 30 - Região perioral da paciente 05 pré e após 28 dias do tratamento	73
Figura 31 - Região perioral da paciente 06 pré e após 28 dias do tratamento	74
Figura 32 - Região perioral da paciente 07 pré e após 28 dias do tratamento	74
Figura 33 - Região perioral da paciente 08 pré e após 28 dias do tratamento	74
Figura 34 - Região perioral da paciente 09 pré e após 28 dias do tratamento	75
Figura 35 - Região perioral da paciente 10 pré e após 28 dias do tratamento	75
Figura 36 - Região perioral da paciente 11 pré e após 28 dias do tratamento	75
Figura 37 - Região perioral da paciente 12 pré e após 28 dias do tratamento	76
Figura 38 - Região perioral da paciente 13 pré e após 28 dias do tratamento	76
Figura 39 - Região perioral da paciente 14 pré e após 28 dias do tratamento	76
Figura 40 - Região perioral da paciente 15 pré e após 28 dias do tratamento	77
Figura 41 - Região perioral da paciente 16 pré e após 28 dias do tratamento	77
Figura 42 - Região perioral da paciente 17 pré e após 28 dias do tratamento	77
Figura 43 - Região perioral da paciente 18 pré e após 28 dias do tratamento	78
Figura 44 - Região perioral da paciente 19 pré e após 28 dias do tratamento	78
Figura 45 - Região perioral da paciente 20 pré e após 28 dias do tratamento	78
Figura 46 - Erupção herpética.....	83
Figura 47 - Erupção acneiforme - pústula (a). Queilite angular (b).....	83
Figura 48 - Complicações pós-laser fracionado microablativo: herpes simples e hiperpigmentação pós-inflamatória. Resolução sem sequelas e fotorejuvenescimento perioral no PO tardio de 4 meses.....	92
Figura 49 - Evolução clínica da paciente pós-laser com erupção herpética	99

Resumo

Odo LM. *Estudo comparativo da pele pré e pós-laser fracionado minimamente ablativo com Erbium-YAG de 2940nm para tratamento de ríides da região perioral : avaliação clínica, histológica e imuno-histoquímica* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010. 136p.

Atualmente existem diversas opções terapêuticas para o tratamento do fotoenvelhecimento cutâneo. Uma das formas de tratamento muito utilizada é a fototerapia com laser. Com o desenvolvimento da tecnologia em lasers surgiu um novo conceito de tratamento da pele envelhecida, a fototermólise fracionada microablativa. Essa tecnologia fracionada visa combinar os efeitos visíveis de uma terapia ablativa com o conforto e segurança dos métodos não ablativos. Antes de atingir a pele o laser passa por uma lente óptica especial que o divide em microrraios. Tal procedimento produz colunas de lesões térmicas microscópicas que penetram na epiderme e derme, sem danificar o tecido circunvizinho. A grande vantagem de ser fracionado é que a pele íntegra ao redor de cada coluna funciona como um reservatório de células potentes para a rápida cicatrização e regeneração da pele, culminando com a produção de colágeno e resultando em uma pele mais jovial, sem o inconveniente de um longo período de recuperação pós-tratamento. 20 pacientes foram selecionadas para o tratamento das ríides periorais com uma sessão de laser Erbium-YAG de 2940nm, fracionado. Após 28 dias do procedimento observou-se melhora na textura da pele, clareamento de manchas e atenuação de rugas finas periorais. Foi realizado um estudo comparativo da quantificação das células de Langerhans e receptores *toll-like* (TLRs) 2, 3 e 9 na epiderme, antes e após 3, 7, 14 e 28 dias do tratamento e da quantificação das fibras de colágeno na derme superior, antes e após 28 dias do laser. Houve diferenças estatisticamente significativas entre as medianas dos valores de CD1a ($p = 0,0085$), TLR 2 ($p = 0,0108$), TLR 3 ($p = 0,0011$) e TLR 9 ($p = 0,0012$) na epiderme pré e pós-tratamento. Foi constatado que a significância se deu entre os valores: antes e após 14 dias para CD1a (diminuição), antes e após 7 dias para TLR 2 (diminuição), antes e após 14 dias para TLR 3 (aumento), antes e após 7 dias para TLR 9 (diminuição). Não se encontraram diferenças estatisticamente significativas entre os valores medianos das fibras colágenas do tipo I ($p = 1,0000$) e III ($p = 0,3125$) antes e após 28 dias do tratamento. O protocolo desse estudo mostrou-se bastante seguro, pois apresentou efeitos colaterais transitórios e nenhuma complicação permanente.

Descritores: 1.Envelhecimento da pele 2.Pele 3.Fototerapia 4.Laser 5.Imunoistoquímica 6.Receptores *Toll-Like* 7.Células de Langerhans

Summary

Odo LM. *Comparative study of skin pre and post fractional photothermolysis with Erbium-YAG 2940nm for the treatment of perioral wrinkles : a clinical, histological and immunohistochemical analysis* [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2010. 136p.

There are several treatment options for skin photoaging. One of them widely used nowadays is lasertherapy. The development of lasers technology introduced a new therapeutic concept for aging skin: ablative fractional photothermolysis. This technology combines the visible effects of an ablative therapy with the comfort and safety of nonablative methods. Before reaching the skin the laser passes through a special optical lens that splits it into tiny rays. This procedure produces columns of microscopic thermal injuries that penetrate the epidermis and dermis, without damaging the surrounding tissue. The great advantage of the fractional photothermolysis is that the intact skin around each column acts as a potent reservoir of cells for fast healing and skin regeneration, resulting in collagen production and a youthful skin without the inconvenience of a long period of recovery after treatment. 20 patients were selected for perioral wrinkles treatment with a session of fractional Erbium-YAG 2940nm. After 28 days of the procedure the perioral skin showed improvement in texture, bleaching of sunspots and attenuation of superficial wrinkles. A comparative study was conducted between the expression of Langerhans cells and toll-like receptors 2, 3 and 9 in the epidermis, before and after 3,7,14 and 28 days of treatment and among collagen fibers in the dermis, before and after 28 days of the laser. There were statistically significant differences between the median values of CD1a ($p = 0.0085$), TLR 2 ($p = 0.0108$), TLR 3 ($p = 0.0011$) and TLR 9 ($p = 0.0012$) in the epidermis pre and post-treatment. The significance occurred between the values: before and after 14 days for CD1a (decrease) before and after 7 days to TLR 2 (decrease) before and after 14 days for TLR 3 (increase) before and after 7 days for TLR 9 (decrease). There were not statistically significant differences between the median values of collagen type I ($p = 1.0000$) and III ($p = 0.3125$) before and after 28 days of treatment. The irradiation of skin with fractional Erbium-YAG was safe, as it showed transitory side effects and no permanent complication.

Descriptors: 1.Skin aging 2.Skin 3.Phototherapy 4.Laser 5.Immunohistochemistry 6.Toll-Like receptors 7.Langerhans cells

1 Introdução

A ação cumulativa da radiação solar adiciona ao envelhecimento cronológico uma série de alterações na pele, denominadas fotoenvelhecimento. A pele, além de se tornar fina e seca, adquire uma tonalidade amarelada, surgindo rugas e pregas que se acentuam progressivamente, bem como manchas claras e escuras, dilatação de vasos e até degenerações malignas (câncer de pele).

Existem diversas opções terapêuticas para o fotoenvelhecimento. Muitas vezes a associação de técnicas é indicada para um resultado mais rápido e satisfatório nos casos mais severos. Uma das formas de tratamento muito utilizada atualmente é a fototerapia com laser.

O laser é um dispositivo que produz radiação eletromagnética com características muito especiais: ela é monocromática (apresenta um único comprimento de onda), coerente, colimada e propaga-se como um feixe unidirecional.

Dentro da fototerapia, os lasers ablativos de CO₂ e Erbium-YAG são considerados os mais efetivos para o fotorejuvenescimento, pois conseguem tratar todas as alterações do fotoenvelhecimento, muitas vezes em apenas uma sessão, podendo até remover lesões de pele benignas, pré-malignas e apresentar benefícios profiláticos na prevenção de neoplasias não melanoma (1, 2). Porém, essa técnica não pode ser realizada em todos os tipos de pele por ser muito agressiva, requerer infraestrutura de sedação e estar associada com potenciais efeitos adversos, como discromias e cicatrizes inestéticas. Além desses fatores, demanda um longo período de recuperação, geralmente 1 a 2 semanas do

processo agudo e 2 a 4 meses em média do eritema pós-laser, tirando o paciente da sua rotina profissional e social (3).

Lasers não ablativos apresentam complicações reduzidas, porém eficácia limitada (4). Apresentam boa ação nas lesões superficiais vasculares e pigmentadas pela melanina, porém múltiplas sessões são necessárias para uma melhora evidente das ríides.

Com o desenvolvimento da tecnologia em lasers e a fim de atender às exigências dos pacientes que não podem parar suas atividades profissionais e sociais, surgiu um novo conceito de tratamento da pele envelhecida: a fototermólise fracionada microablativa. Essa tecnologia fracionada visa combinar os efeitos visíveis de uma terapia ablativa com o conforto e segurança dos métodos não ablativos.

Este estudo analisou os resultados clínicos da região perioral fotoenvelhecida após 28 dias do tratamento com laser de Erbium- YAG fracionado microablativo, bem como a produção de fibras colágenas avaliada pela coloração de Picrosírius em biópsias de pele.

Os tratamentos que fazem ablação cutânea alteram a resposta imunológica da pele, aumentando a incidência das infecções virais e bacterianas. Ainda não há estudos científicos publicados que demonstrem a resposta biológica da imunidade da pele no pós-laser fracionado microablativo, já que esta tecnologia é bastante recente, tornando um estudo nesta área inédito. Existem apenas dados imuno-histoquímicos que ratificam a indução da resposta de cicatrização como aumento do colágeno tipo III, proteína de choque térmico 70 e actina alfa de músculo liso, após esse tipo de tratamento (5).

Assim foi proposta uma pesquisa sobre o comportamento de alguns fatores da imunidade cutânea, quantificando as células de Langerhans e TLR 2, 3 e 9 na epiderme, através da reação de imuno-histoquímica com anticorpos específicos, antes do tratamento e após 3, 7, 14 e 28 dias da irradiação da pele com Erbium-YAG fracionado de 2940nm minimamente ablativo.

2 Objetivos

O propósito deste trabalho foi avaliar o laser de Erbium-YAG fracionado microablativo para o tratamento de ríntides da região perioral, por:

- ❖ Avaliação clínica da região perioral quanto à melhora das ríntides após 28 dias do tratamento.

- ❖ Avaliação anátomo-patológica da pele facial pelas colorações de H/E e Picrosírius antes e após a irradiação da pele com o laser.

- ❖ Avaliação de alguns aspectos da imunidade cutânea, quantificando as células de Langerhans e TLR 2, 3 e 9 na epiderme por meio da imuno-histoquímica, com anticorpos específicos, pré e pós-tratamento com o laser.

Esse estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da diretoria clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo com protocolo de pesquisa número 1184/07.

3 Revisão da literatura

3.1 Fototermólise fracionada

Em 2004, Manstein e col. introduziram um novo conceito de rejuvenescimento da pele, chamado de fototermólise seletiva fracionada. Esse conceito de emissão fracionada da luz para criar zonas de tratamento microscópicas tem o intuito de contornar a agressividade dos lasers ablativos tradicionais, que provocam injúria confluyente e uniforme da pele, aumentando o período de cicatrização cutânea e complicações pós-laser. Ao mesmo tempo, apresenta maior eficiência em relação aos lasers não ablativos para o tratamento do fotoenvelhecimento cutâneo (6). Análises histológicas realizadas após a irradiação da pele com o protótipo utilizado por Manstein mostraram necrose da epiderme e derme nas zonas de tratamento, porém o estrato córneo manteve-se intacto, caracterizando esse tratamento como não ablativo.

Antes de atingir a pele o laser passa por uma lente óptica especial que o divide em microrraios. Tal procedimento produz colunas de lesões térmicas microscópicas que penetram na epiderme e derme, sem danificar o tecido circunvizinho. Diversos parâmetros como energia, duração do pulso, densidade de microrraios, número de pulsos no mesmo local (stack pulse) etc., podem ser manipulados para customizar o tratamento, produzindo colunas tridimensionais com formas e profundidades diferentes, de acordo com cada afecção a ser tratada.

A grande vantagem de o laser ser fracionado é que a pele íntegra ao redor de cada coluna funciona como um reservatório de células potentes para a rápida cicatrização e regeneração da pele, culminando com a produção de colágeno e resultando em uma pele mais jovial, sem o inconveniente de um longo período de recuperação pós-tratamento (6, 7).

Entre 5 e 7 dias depois, a pele tratada já está livre dos debris necróticos celulares por extrusão transepidermica, ficando apenas um leve eritema facilmente mascarado por cosméticos, estando o paciente pronto para voltar à sua rotina. Por meio dos debris necróticos microscópicos a melanina também é eliminada, promovendo o clareamento da pele gradativamente (6, 8).

As figuras 1, 2 e 3 ilustram o processo de cicatrização da pele após irradiação com laser fracionado.

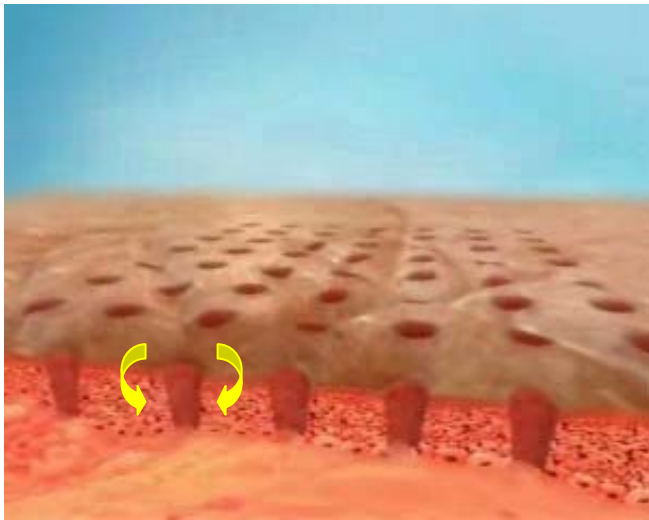


Figura 1 - Pele intacta ao redor dos pixels é fonte de células potentes que promovem rápida cicatrização das áreas fotodanificadas.

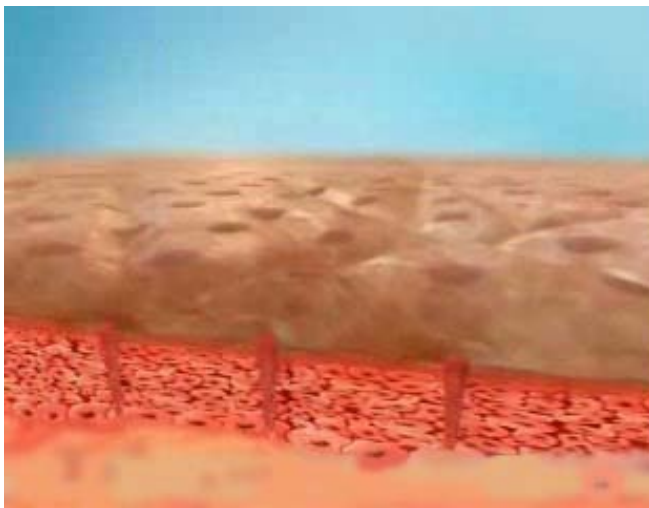


Figura 2 - Cicatrização das áreas fotodanificadas em progressão.



Figura 3 - Completa cicatrização da pele.

Mais recentemente, em 2007, surgiram outros aparelhos com emissão de luz fracionada, porém utilizando lasers ablativos como o Erbium-YAG de 2940nm e CO2 de 10,600nm. O tratamento com esses aparelhos também produz colunas de tratamento microscópicas; a diferença é que promovem lesões confluentes de ablação e coagulação da pele com dano no estrato córneo. Há, portanto, formação de crostículas visíveis na superfície cutânea que se desprendem rapidamente em menos de 1 semana. Os lasers fracionados ablativos costumam ser mais agressivos e promovem maior reação inflamatória e tempo de recuperação um pouco mais prolongado, mas possui o mesmo perfil de efeitos colaterais em relação aos aparelhos fracionados não ablativos. Muitos estudos comparativos mostraram que o grau de melhora do fotoenvelhecimento com a fototermólise fracionada ablativa é superior quando comparado com os lasers fracionados não ablativos (9). Hantash e col. confirmaram pela imuno-histoquímica que há remodelação persistente de colágeno por pelo menos 3 meses após aplicação do laser de CO2 fracionado no antebraço de humanos (10).

3.1.1 Indicações terapêuticas

A fototermólise fracionada representa uma alternativa segura e efetiva para o tratamento de algumas condições dermatológicas, como: fotoenvelhecimento (11), cicatrizes inestéticas (12, 13), melasma (14), granuloma anular (15), pigmentação cutânea por minociclina (16), nevus de Baker (17), nevus de Ota (18), siringoma (19). Pode ser aplicada em diferentes partes do corpo, como face, colo, pescoço e mãos (20, 21, 22).

Uma revisão da literatura realizada por Tierney e col. ainda inclui poiquilodermia de Civatte, hemangioma residual, mília colóide e poroqueratose actínica superficial disseminada na lista de patologias que foram tratadas pela fototermólise fracionada com sucesso (9).

3.1.2 Contraindicações

Infecções ativas no local a ser tratado, patologias dermatológicas que apresentam o fenômeno de Köebner, qualquer condição que prejudique a boa cicatrização da pele como áreas com radiodermite ou queimadura são contraindicações para o tratamento com laser fracionado. Pacientes com antecedentes pessoais de quelóide ou doenças sistêmicas descompensadas devem evitar esse procedimento (6). O uso de isotretinoína oral não é impeditivo para a realização do procedimento, mas sabe-se que esse medicamento pode alterar o processo de cicatrização, de modo que alguns cuidados devam ser tomados, como a redução ou suspensão da dose até o completo restabelecimento da pele.

A fototermólise fracionada não é indicada para tratar lesões neoplásicas.

3.1.3 Complicações

Os efeitos colaterais descritos para a fototermólise fracionada são leves e transitórios (2 - 7 dias), caracterizam-se por: ardor, eritema (100%), edema (82%), ressecamento (86,6%), descamação (60%), prurido (37%), hiperpigmentação (26,6%), aumento da sensibilidade local (10%) e erupção acneiforme (10%) (23). Avaliação pré-operatória, operador apropriadamente treinado e abordagem cuidadosa são

importantes para minimizar ainda mais tais problemas. Outras complicações relatadas com a fototermólise fracionada foi o aparecimento de queratoacantoma eruptivo após o tratamento do fotoenvelhecimento nos membros inferiores (24) e infecções herpéticas após o tratamento da região perioral (8).

Graber e col. demonstraram que, dos 961 tratamentos realizados com laser fracionado, apenas 7,6% apresentaram algum tipo de complicação, sendo os mais frequentes erupção acneiforme (1,87%) e surto de herpes (1,77%). Os efeitos colaterais e complicações foram igualmente distribuídos independentemente da idade, tipo de pele, anatomia, parâmetros do laser, exceto pela hiperpigmentação pós-inflamatória, que ocorreu com maior frequência nos pacientes de pele escura (25).

3.2 Envelhecimento da região perioral

O envelhecimento cronológico causa uma série de alterações estruturais na pele. A epiderme afina, os corneócitos ficam menos aderentes entre si e a junção dermoepidérmica se torna plana. O número de melanócitos e células de Langerhans diminui. A derme se torna atrófica e apresenta diminuição das células e vasos. O colágeno, a elastina e os glicosaminoglicanos são alterados. O tecido subcutâneo diminui em algumas áreas como a face. Há redução do número de glândulas écrinas e sebáceas, assim como da produção de suas secreções (26). A pele se torna fina, seca, opaca e frágil, mais suscetível às agressões do meio ambiente.

Outras alterações fisiológicas que gradativamente ocorrem nos idosos, como a atrofia do músculo perioral, as alterações da arcada dentária e a reabsorção óssea

facial, comprometem a sustentação dos tecidos moles. Associadas à atrofia da pele, promovem introversão dos lábios para a cavidade oral, aumentando o espaço entre o lábio superior e o nariz, o tamanho do mento e a queda das comissuras labiais.

As ríides periorais são formadas pela contração repetida do músculo perioral decorrente da mímica facial no ato de falar, comer, fumar ou praticar instrumentos de sopro. A princípio são rugas dinâmicas nos indivíduos jovens, que ao longo do tempo se tornam estáticas, ou seja, permanecem aparentes mesmo sem a expressão facial (27).

A radiação ultravioleta (UV) afeta a pele de forma adversa por meio de múltiplas e complexas vias. O envelhecimento precoce da pele é um dos efeitos nocivos decorrente da exposição solar crônica. Além de manchas, dilatações vasculares e neoplasias, a radiação UV também induz a expressão de certos membros da família metaloproteinases, como colagenase, gelatinase e estromelisina, que são enzimas que degradam o colágeno, fibras elásticas e proteoglicanas, comprometendo a arquitetura normal do tecido conectivo da pele (28,29).

A degradação do tecido conectivo é seguida por reparo como em qualquer cicatrização de injúria tecidual, porém de forma imperfeita, formando uma “cicatriz solar” conhecida como elastose. Intermitentes exposições solares levam ao acúmulo dessas cicatrizes, que leva ao aspecto envelhecido da pele (30).

O tabagismo pode estar relacionado com o maior envelhecimento da região perioral, pois contribui com a formação das rugas dinâmicas pelo ato repetitivo de aspirar e soprar a fumaça, que por sua vez é quente e tóxica, causando irritação, secura e formação de radicais livres na pele circunjacente. Sabe-se que também há um aumento de metaloproteinases (MMP-1), ocasionando um desequilíbrio entre a

biossíntese e a degradação no metabolismo do tecido conectivo dérmico, com o aumento da produção de material elastótico (31).

Um fato curioso é que a mulher apresenta maior suscetibilidade a desenvolver rugas periorais. Paes e col. buscaram uma explicação plausível para esse fato por meio de análises histológicas da pele perioral de cadáveres humanos de ambos os sexos. Encontraram na pele masculina um maior número de glândulas sebáceas e sudoríparas e maior densidade de vasos e tecido conectivo na derme. A quantidade de folículos pilosos não foi diferente entre homens e mulheres, porém o número de glândulas sebáceas por folículo foi maior nos homens (32).

3.3 Mecanismos de defesa da pele

A epiderme constitui a primeira linha de defesa contra as ameaças nocivas do meio ambiente. Além de barreira física, ela tem um importante papel imunológico em detectar os patógenos invasores.

Outro fator de proteção importante presente nas mucosas são os ambientes ácidos existentes na cavidade oral, gástrica e no ambiente vaginal, os quais atuam como barreira química contra a penetração de microrganismos, como por exemplo os vírus (33).

Os queratinócitos são a maioria celular na epiderme e produzem produtos antimicrobianos como o óxido nítrico, catelicidina, antileucoprotease e B-defensinas. Esses polipeptídios formam poros nas membranas ricas em fosfolipídios aniônicos como as dos vírus, causando sua destruição (34). Tais peptídeos também têm a

função de mediadores da inflamação, agindo nas células epiteliais e inflamatórias e influenciando na liberação de citocinas, proliferação celular, angiogênese, cicatrização e quimiotaxia (35).

A imunidade inata já foi considerada uma resposta inflamatória inespecífica e imediata do organismo, cuja função primária era recrutar e ativar neutrófilos e macrófagos para fagocitar microrganismos. Atualmente sabe-se que a resposta imune inata apresenta especificidade considerável, pois atua diretamente contra padrões moleculares presentes nos patógenos. Receptores reconhecedores desses padrões são importantes para iniciar a ativação do sistema imune inato. Uma variedade de receptores intra e extracelulares são conhecidos como: receptores toll-like (TLRs), nod-like e rig-like. Dentro desse complexo sistema de receptores celulares do sistema imune, os receptores toll-like são os melhor caracterizados (36).

A ativação dos TLRs não apenas estimulam a produção dos peptídeos antimicrobianos e citocinas pró-inflamatórias, como também liga a imunidade inata com a adaptada. Essa ponte ocorre através da maturação das células dendríticas controlada pelos TLRs. Na pele normal, as células de Langerhans e dendríticas da derme não apresentam ou apresentam uma leve expressão de MHC (complexo principal de histocompatibilidade) e moléculas coestimuladoras, e por isso são incapazes de ativar os linfócitos T (37).

Em resposta a uma infecção, as células dendríticas degradam os antígenos microbianos em peptídeos de ligação MHC classe I ou II, aumentam a expressão das moléculas coestimuladoras e migram do local infectado para os linfonodos, onde interagem com os linfócitos T virgens, ativando a resposta imune adaptada.

Atualmente são conhecidos diversos padrões de resposta imune adaptada, como Th1, Th2, Th17, Th0. A decisão do sistema por seguir algum desses caminhos depende dos fatores imunológicos presentes no sítio de infecção como as citocinas, quimiocinas, hormônios, glicose e oxigenação local. Outro mecanismo da imunidade adaptada muito eficiente é a produção de anticorpos específicos para cada patógeno, produzidos pelas células B. Os anticorpos atuam como moléculas neutralizantes, evitando a ligação dos microrganismos ao receptor específico na célula hospedeira ou realizando a opsonização das partículas desses agentes, facilitando a sua fagocitose. Por fim, o anticorpo também pode ativar a via clássica do complemento, levando a lise das células infectadas (33).

3.3.1 Receptores toll-like

Os TLRs representam uma família de glicoproteínas transmembrana, que são peças chaves na resposta imunológica inata. Reconhem vários componentes de microorganismos, o que conseqüentemente ativa o fator nuclear de transcrição NF- κ B, levando à formação de citocinas, quimiocinas e peptídeos antimicrobianos, e ao aumento de expressão de moléculas de adesão e coestimuladoras envolvidas na resposta imunológica inata e adquirida (38).

Cada receptor reconhece, especificamente, um padrão molecular associado a um patógeno, tanto de bactérias G⁺ ou G⁻, vírus, fungos e protozoários. Existem algumas evidências que estes receptores também podem reconhecer ligantes endógenos como hialuronan, proteína de choque térmico e fibronectina (39).

Muitas vezes alguns TLRs associam-se com outros, formando heterodímeros para poder discriminar diferenças sutis entre componentes microbianos.

É estimado que a maioria dos mamíferos possui de 10 a 15 tipos de TLR. Nos seres humanos, foram classificados 10 receptores até o momento, e todos apresentam a mesma estrutura básica de uma glicoproteína transmembrana do tipo 1. Esta possui um domínio externo rico em leucina N-terminal, uma porção transmembrana e uma cauda citoplasmática, que é homóloga ao receptor da interleucina-1, responsável pelo início da cascata de sinais intracelulares. Estes sinais incluem a ativação tanto da via NF-kappaB quanto da MAP kinase por intermédio de um adaptador molecular comum My88 (fator mielóide diferencial 88) que é universal para a maioria dos TLR, com exceção do TLR 3 (40).

Outros quatro adaptadores independentes da via My88 foram identificados; são eles: TIRAP, TRIF, TRAM, SARM, sendo que o TLR 3 utiliza o TRIF para iniciar sua sinalização da resposta imune inata (41).

Características dos receptores toll-like (38, 40, 41, 42, 43):

- ❖ TLR 1: Está ancorado na membrana plasmática celular e geralmente forma um heterodímero com o TLR 2. Esse complexo reconhece lipopeptídeos triacetilados presentes, por exemplo, nas bactérias *M. tuberculosis* e *B. burgdorferi* (36) e nas proteínas porinas de espécies patogênicas de neissérias. Pode ainda formar heterodímero com TLR 10, mas o seu ligante ainda é desconhecido.
- ❖ TLR 2: A versatilidade desse receptor em reconhecer componentes de diversos patógenos pode ser explicada pela sua habilidade de formar heterodímeros com TLR 1, 6 e 10. O ligante do complexo TLR 2/10 é desconhecido, TLR 1/2 reconhece os lipopeptídeos triacetilados como mencionado acima, e TLR 2/6, os

lipopeptídeos diacetilados. Outros ligantes como peptidoglicanos e ácido lipoteicóico de parede bacteriana, lipoglicanos de parede micobacteriana, zimosan de parede de leveduras e lipopolissacarídeos podem ativar o TLR 2. Ratos com deficiência de TLR 2 mostraram suscetibilidade para infecção por *S. aureus*.

Alguns trabalhos sugerem que o TLR 2 também apresenta papel na resposta contra infecções virais da família herpes (44, 45).

Há relatos de ligantes endógenos como as proteínas de choque térmico (Hsp60, Hsp70 e Gp96) e proteínas marcadoras de dano tecidual como a HMGB1, que também podem ativar o TLR 2.

- ❖ TLR 3: Difere dos outros TLRs, pois é o único que não sinaliza pela via My88, mas exclusivamente via TRIF. Esse receptor liga-se com RNA viral de cadeia dupla (dsRNA) e com ligantes endógenos de células necróticas. Além disso, a ativação do TLR 3 está sendo associada com o desenvolvimento de várias doenças autoimunes hepáticas e renais, diabetes e artrite reumatóide (46, 47), sugerindo um importante papel no delicado balanço entre resposta imune e tolerância deste receptor.
- ❖ TLR 4: Foi o primeiro TLR humano a ser identificado e responde aos lipopolissacarídeos de bactérias G-, proteína F do vírus respiratório sincicial. Também apresenta diversos ligantes endógenos como proteínas de choque térmico (Hsp60, Hsp70) e fibronectina.
- ❖ TLR 5: O único ligante conhecido para esse receptor é a flagelina, proteína principal do flagelo de bactérias G- que apresenta propriedade imunoestimulatória. O TLR 5 pode sinalizar sozinho ou formando heterodímero com TLR 4.

- ❖ TLR 6: Forma heterodímero com TLR 2 e liga-se especificamente com os lipopeptídeos diacetilados.
- ❖ TLR 7: A expressão desse receptor parece estar restrita às células dendríticas e linfócitos B. Divide seu ligante com o TLR 8, ambos reconhecem RNA viral de cadeia simples (ssRNA) ou de fontes endógenas. Agonistas do TLR 7 ativam a via interferon das células dendríticas plasmocitóides.
- ❖ TLR 8: Apesar de reconhecer ssRNA como o TLR 7, há achados que demonstram que o TLR 8 responde a uma sequência específica de RNA, a fim de modular a resposta imune de acordo com o vírus invasor. Oligoribonucleotídeos com regiões ricas em adenosina/uracil provocam produção de TNF em monócitos e células dendríticas mielóides quando reconhecidos pelo TLR 8.
- ❖ TLR 9: Localizado no endossomo como os TLRs 3, 7 e 8, o TLR 9 pertence à família de reconhecedores de ácidos nucleicos. Seu ligante é o DNA contendo CpG não metilado (48), que é bastante comum em bactérias e vírus, fazendo contraste com os mamíferos onde o DNA rico em CpG é raro e na sua maioria metilado.

A administração de CpG DNA em experimentos com modelo animal mostrou uma indução potente da resposta imune Th1, que protege contra diversas desordens infecciosas e imunológicas. Algumas pesquisas estão sendo conduzidas para futuramente empregar o CpG DNA em vacinas para o combate de doenças infecciosas, neoplasia e alergia.

O perfil de expressão do TLR 9 é semelhante ao TLR 7. É expresso nos linfócitos B e células dendríticas plasmocitóides, mas pode ser encontrado nas células epiteliais intestinais e queratinócitos.

A expressão do TLR 9 na epiderme humana é mais superficial nas camadas superiores onde os queratinócitos são mais diferenciados (38).

- ❖ TLR 10: O último TLR humano descoberto, sua estrutura lembra os TLRs 1 e 6, sinalizando sozinho ou formando heterodímeros com os TLRs 1 e 2. Sua expressão é descrita apenas nos linfócitos B e células dendríticas plasmocitóides. Até o momento não se sabe qual seu ligante específico e sua via de ação.

A tabela 1 resume as moléculas reconhecidas, a resposta induzida após o reconhecimento de seus ligantes e a função de cada TLR (49).

Tabela 1 - TLR e suas características

TLR	Moléculas reconhecidas	Resposta induzida	Função
1	<ul style="list-style-type: none"> Lipopeptídeos triacilados 	<ul style="list-style-type: none"> TNF-α, IL-12. 	<ul style="list-style-type: none"> Defesa contra micobactérias.
2	<ul style="list-style-type: none"> Peptidoglicanos, Lipoproteínas bacterianas, Zimosan, Ácido lipoteicóico, Lipopolissacarídeos (<i>P.gingivalis</i>, <i>L.interrogans</i>), Glicosilfosfatidilinositol (<i>T.cruzi</i>). 	<ul style="list-style-type: none"> TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, NO, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13. 	<ul style="list-style-type: none"> Defesa contra bactérias G+, micobactérias, micoplasma, protozoário e fungo, Percepção do estresse oxidativo e necrose celular, Indução de apoptose, Indução de beta defensina 2, Ativação e degranulação de mastócitos.
3	<ul style="list-style-type: none"> ds-RNA. 	<ul style="list-style-type: none"> IFN-β 	<ul style="list-style-type: none"> Defesa antiviral.
4	<ul style="list-style-type: none"> Lipopolissacarídeo (G-), Proteína F, Proteína de choque térmico, Fibronectina. 	<ul style="list-style-type: none"> TNF-α, IFN-β, IL-1, IL-6, IL-10, IL-13, Proteína inflamatória de macrófagos 1$\alpha\beta$, NO, Leucotrieno, Prostanóide. 	<ul style="list-style-type: none"> Defesa contra bactérias G-, fungos e vírus, Indução de apoptose.
5	<ul style="list-style-type: none"> Flagelina. 	<ul style="list-style-type: none"> TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-10, IFN-γ, NO. 	<ul style="list-style-type: none"> Defesa contra bactérias flageladas, Maturação de células dendríticas.
6	<ul style="list-style-type: none"> Lipopeptídeo ativador de macrófago-2 (micoplasma), Modulina solúvel em fenol (<i>S.epidermidis</i>). 	<ul style="list-style-type: none"> TNF-α 	<ul style="list-style-type: none"> Defesa contra bactérias, fungos, micoplasma e protozoários.

Continua...

Conclusão Tabela 1

TLR	Moléculas reconhecidas	Resposta induzida	Função
7	<ul style="list-style-type: none"> • ss RNA, • Loxoribina, • Bropirimina, • Análogos da guanosina, • Imiquimod e resiquimod. 	<ul style="list-style-type: none"> • TNF-α, • IL-1, • IL-6, • IL-8, • IL-12, • IL-18, • IFN-γ, • IFN-β, • GM-CSF, • Superóxidos (eosinófilos). 	<ul style="list-style-type: none"> • Defesa antiviral e antitumoral, • Maturação de células dendríticas, • Ativação e migração das células de Langerhans da pele para os linfonodos, • Desenvolvimento Th1, • Ativação de células NK, • Proliferação de linfócitos B, • Ativação de eosinófilos.
8	<ul style="list-style-type: none"> • ssRNA, • Resiquimod, • Loxoribina, • Bropirimina. 	Similar ao TLR 7.	Similar ao TLR 7.
9	<ul style="list-style-type: none"> • CpG – DNA não metilado (bactéria e vírus). 	<ul style="list-style-type: none"> • IFN-α -células dendríticas plasmocitóide, • IFN-γ (células NK), • IFN-β, • IL-6, • IL-12. 	<ul style="list-style-type: none"> • Defesa antibacteriana e antiviral, • Desenvolvimento Th1, • Proliferação de linfócitos B, • Maturação de células dendríticas.
10	Desconhecido.	Desconhecido.	Desconhecido.

CpG-DNA = citosina guanina dinucleotídeo-ácido desoxirribonucleico; G+ = gram positivo; G- = gram negativo; GM-CSF = fator estimulador de colônia de granulócitos-macrófagos; IFN = interferon; IL = interleucina; NK = natural killer; NO = óxido nítrico; ssRNA = ácido ribonucleico cadeia simples; dsRNA = ácido ribonucleico cadeia dupla; Th1 = linfócito T helper 1; TNF = fator de necrose tumoral.

Embora alguns receptores estejam localizados na membrana celular (TLRs 1, 2, 4, 5, 6, 10), outros estão ancorados no retículo endoplasmático e endossomo intracelular (TLRs 3, 7, 8, 9) (38).

São expressos em todo tecido linfóide, mais intensamente em leucócitos do sangue periférico, monócitos, linfócitos B e T, granulócitos e células dendríticas. Também foram identificados em células epiteliais intestinal, pulmonar e renal, diferentes células do sistema nervoso central, cardiomiócitos e fibroblastos sinoviais.

Na pele são expressos nos queratinócitos, células de Langerhans, melanócitos, mastócitos, células dendríticas, células endoteliais da microvascularização dérmicas e células do estroma cutâneo, como os adipócitos e fibroblastos (tabela 2).

Tabela 2 - Expressão dos TLRs nas células cutâneas (49, 50)

	TLR 1	TLR 2	TLR 3	TLR 4	TLR 5	TLR 6	TLR 7	TLR 8	TLR 9	TLR 10
Queratinócito	S	S	S	S	S	S	N	N	S	S
Langerhans	F	S	S	S	F	F	F	S	F	S
Melanócito	D	D	D	S	D	D	D	D	D	D
Células dendríticas	S	S	N	S	S	S	N	S	S	D
Fibroblastos	D	S	S	S	S	D	N	N	N	D

S = expressão normal; N = sem expressão; F = expressão fraca; D = desconhecido.

A ativação aberrante dos receptores toll-like está associada às doenças inflamatórias crônicas e autoimunes da pele, trato gastrointestinal, rins, pulmão, articulações e sistema nervoso central, sugerindo que ligantes endógenos como proteínas intracelulares ou produtos da clivagem dessas proteínas poderiam estimular os receptores toll-like, que não apenas seriam importantes para mediar a resposta contra infecções, mas também contra o dano e morte celular (51).

A sinalização dos TLRs é controlada por mediadores negativos para limitar a resposta imune e inflamatória, prevenindo a inflamação excessiva. Esta regulação

negativa pode ser alcançada em múltiplos níveis: sequestrando ou bloqueando o recrutamento das moléculas de sinalização, degradação das proteínas alvo ou inibindo a transcrição (39).

Além disso, nos últimos anos descobriu-se que a ativação dos receptores toll-like não serve exclusivamente para iniciar a resposta imune inata, por já ter sido demonstrado que a interação destes receptores com a microflora comensal no trato gastrointestinal é importante para a manutenção da homeostase nessa região (52).

3.3.2 Células de Langerhans

As células de Langerhans constituem 2% a 8% da população celular total da epiderme. São consideradas hoje células monocitárias macrofágicas, dendríticas e desprovidas de tirosinase (DOPA negativo) com função imunológica, atuando no processamento primário de antígenos exógenos que atingem a pele (53).

São caracterizadas na microscopia eletrônica por corpúsculos peculiares com a forma de raquete de tênis, denominados grânulos de Langerhans.

Originam-se na medula óssea, são mantidas em reservatórios precursores da medula óssea e também por meio da atividade mitótica que uma pequena parcela de sua população epidérmica possui.

Além de sua localização epidérmica, as células de Langerhans são encontradas na derme, nos linfáticos da derme, linfonodos e timo (54). A distribuição das células de Langerhans na epiderme é topograficamente variável, sendo mais abundantes na cabeça, face, pescoço, tronco e membros, existindo em menor número nas regiões palmo-plantares, genitais e região sacro-coccígea.

Alterações qualitativas e quantitativas das células de Langerhans têm sido registradas em várias condições patológicas, como vitiligo, lupus eritematoso, micose fungóide, histiocitose X e dermatite atópica (55).

Possuem receptores para a fração Fc da IgG e da IgE, para C3 e expressam antígenos de histocompatibilidade classe II. Portanto, fenotipicamente, as células de Langerhans são positivas para CD45, CD45-Ro, HLA-A/ B/ C, HLA-DR/DQ/DP (Ia), CD1a, CD4, S100, vimentina, LAG, T200 e C3. Também demonstram positividade a receptores de moléculas de adesão ICAM-1, LFA-3 e CD11/CD18 do grupo das integrinas (54).

Graças a esta estrutura imunológica, a célula de Langerhans é capaz de reconhecer antígenos, processá-los e apresentá-los aos linfócitos T, iniciando, assim, sua ativação.

É possível que por meio destas propriedades imunológicas as células de Langerhans participem não somente nas reações de sensibilização das dermatites de contato, mas, também, da rejeição de enxertos, na proteção às infecções virais e também na eliminação de clones de células epiteliais neoplásicas originadas na pele (55).

Foi demonstrado que logo após a inoculação do HSV-1 na pele há um aumento da densidade das células de Langerhans no sítio infeccioso. Tais células capturam ativamente o antígeno viral da epiderme. As células de Langerhans infectadas pelo HSV não sofrem maturação adequada estimulada pelos TNF α e IL-1 β secretados pelos queratinócitos contaminados, e acabam por sofrer apoptose na própria epiderme ou na derme quando estão migrando para os linfáticos. Os fragmentos das células de Langerhans apoptóticas são fagocitados por células dendríticas vizinhas não infectadas (células de Langerhans epidérmicas ou células

dendríticas dérmicas) que por sua vez migram para o linfonodo periférico, onde apresentam estes antígenos às células T, desencadeando a resposta imune contra o vírus (56, 57).

Foi também demonstrado por inúmeros trabalhos que a supressão e/ou eliminação das células de Langerhans na pele por irradiação UV (58), uso de corticóides (54), dermoabrasão, *peelings* (69) ou *resurfacing* a laser (60) leva ao aumento da virulência do HSV-1 e à propensão do vírus em estabelecer latência (61).

O herpes simples vírus (HSV tipos I e II) pode ser ativado por procedimentos de *resurfacing* ablativo a laser, prejudicando a cicatrização da pele e causando sérias complicações no pós-operatório, como cicatrizes inestéticas (62). As altas taxas de infecção após a realização das técnicas de ablação da pele sugerem que estes procedimentos ocasionem diminuição da resposta imunológica cutânea.

Medicamentos antivirais profiláticos são rotineiramente administrados aos pacientes que se submetem ao *resurfacing*, com o intuito de inibir uma reativação dos HSV, independentemente da história pessoal da doença. Porém, o tipo de medicamento (aciclovir, famciclovir ou valaciclovir), dose (1 a 2 vezes ao dia) e duração do tratamento variam conforme a literatura estudada (63, 64). O tratamento profilático começa entre 1 e 2 dias ou no dia do procedimento e pode perdurar de 5 a 14 dias pós-laser (65, 66, 67).

Os antivirais são custosos e podem apresentar efeitos colaterais leves ou severos, como: náuseas, vômitos, diarreia, dores abdominais, erupções cutâneas, reações neurológicas, fadiga, aumento das enzimas hepáticas e bilirrubinas, aumento da uréia e da creatinina sanguínea e pancitopenia (68, 69, 70, 71).

Apesar de múltiplos mecanismos de defesa do organismo hospedeiro atuarem contra o HSV, a imunidade mediada por células tem sido considerada como o principal mecanismo de controle e proteção contra esta infecção (72, 53).

As primeiras células imunoativas responsáveis pelo controle da transmissão do herpes simples vírus (HSV) são os queratinócitos e as células de Langerhans, constituintes normais da epiderme dos seres humanos e todos eles expressão TLRs 2, 3 e 9 (56).

A infecção dos queratinócitos pelo HSV induz uma secreção sequencial de citocinas e quimiocinas que promove a quimiotaxia de monócitos e linfócitos CD4 e CD8 na lesão para a erradicação do vírus (73).

A possível diminuição das células de Langerhans e dos TLRs 2, 3 e 9 na epiderme após fototermólise fracionada minimamente ablativa pode comprometer a imunidade inata e adaptada da pele contra o vírus, aumentando o risco de primoinfecção ou uma reativação do HSV.

Desta forma seria prudente e não mais empírico prescrever profilaticamente medicamentos antivirais orais aos pacientes que serão submetidos a este tipo de tratamento, mesmo correndo os riscos dos efeitos colaterais próprios desta classe de drogas.

4 Método

4.1 Casuística

20 mulheres com idade entre 41 e 80 anos, cor de pele Fitzpatrick até IV, com fotoenvelhecimento da região perioral foram selecionadas para participar deste estudo prospectivo de caso controle. Após explicação detalhada do estudo, todas as pacientes assinaram um termo de consentimento para a aplicação do laser, realização das biópsias e permissão do uso das fotos clínicas e anátomo-patológicas.

Foram excluídas pacientes com:

- ❖ Lesões pré-malignas e malignas da pele perioral, bem como lesões dermatológicas em atividade, doenças infecto-contagiosas ou com potencial para fenômeno de Köebner,
- ❖ Presença de doenças sistêmicas descompensadas como diabetes, discrasias sanguíneas, hipertensão arterial, cardiopatia, hepatopatia, nefropatia, doenças neurológicas ou psiquiátricas e imunodepressão,
- ❖ Alterações qualitativas e quantitativas das células de Langerhans presentes nos pacientes com vitiligo, lupus eritematoso, micose fungóide, histiocitose X e dermatite atópica,
- ❖ História de cicatrizes hipertróficas ou quelóides,

- ❖ Procedimento cirúrgico ou cosmiátrico na região perioral nos 12 meses anteriores,
- ❖ Uso de isotretinoína oral nos 12 meses anteriores,
- ❖ Alergia a lidocaína, necessária para a realização das biópsias,
- ❖ Cor de pele tipo V e VI de Fitzpatrick, pois um único tratamento com o laser fracionado poderia causar irregularidades na coloração cutânea,
- ❖ Gravidez ou em lactação.

4.2 Método

4.2.1 Descrição do aparelho

O estudo utilizou o laser de Erbium-Yag fracionado de 2940nm denominado Pixel[®] que foi desenvolvido para acoplar na plataforma multifuncional Harmony[®] (Alma Lasers, Israel). Ele tem um alto coeficiente de absorção pela água ($\sim 10^4 \text{ cm}^{-1}$), promovendo finas ablações teciduais associadas a lesões térmicas residuais de coagulação da área adjacente, formando colunas de tratamento microscópicas. Macroscopicamente formam pontos brancos carimbados na pele no pós-laser imediato chamados de pixels (figura 4).

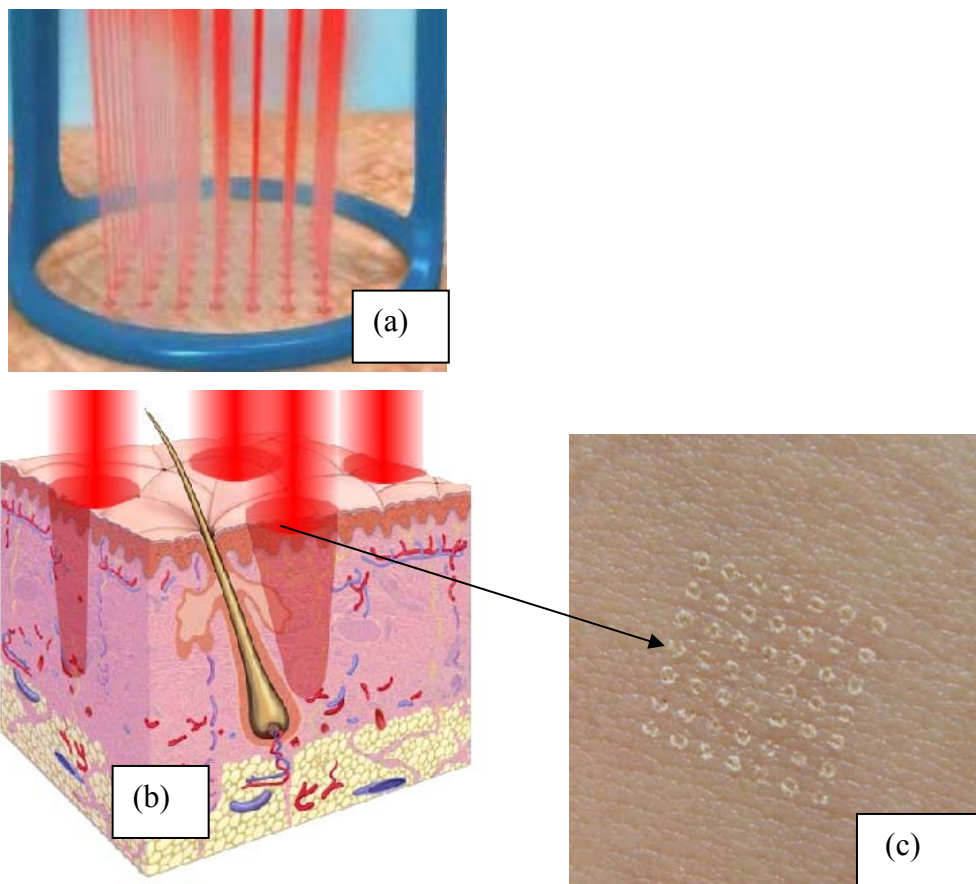


Figura 4 - Fracionamento do raio laser em micro-raios (a). Cada micro-raio forma colunas de lesões térmicas na epiderme e derme (b), deixando pontos carimbados na pele chamados de pixels (c)

Antes de atingir a pele, o raio laser passa por uma lente óptica especial que o divide em micro-raios, arranjados em 2 padrões: 7x7 com 49 pixels ou 9x9 com 81 pixels, dentro de uma área constante de 11 mm² (figura 5).

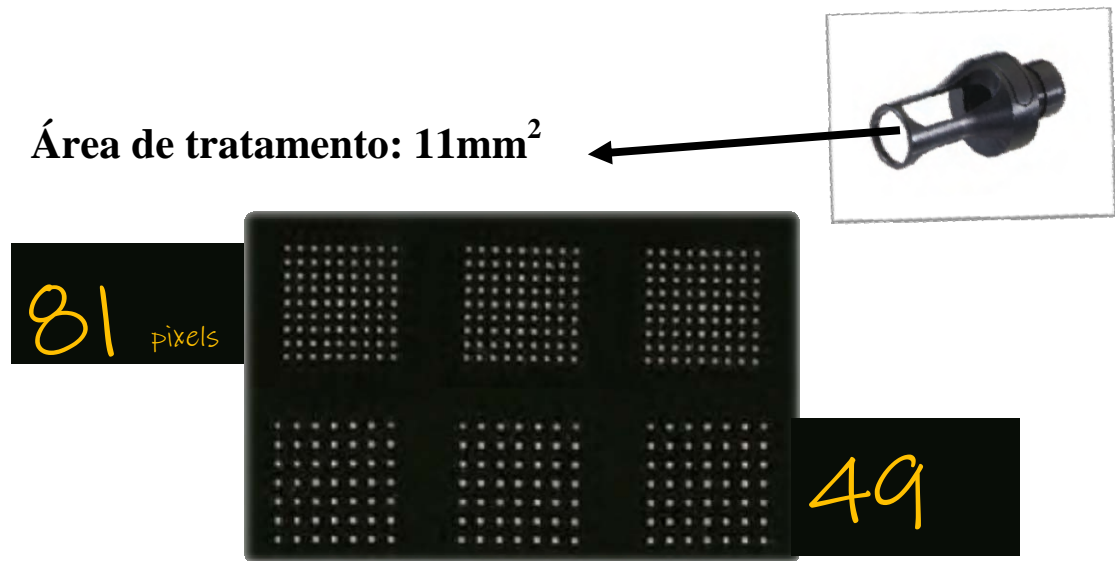


Figura 5 - Dois padrões de tratamento possíveis: 49 ou 81 pixels, em área constante de 11mm²

Considerando a mesma fluência, na ponteira 7x7 a energia térmica distribuída em cada pixel é maior e penetra mais profundamente que na 9x9. Por isso a ponteira 7x7 está mais indicada para tratar cicatrizes e rugas mais profundas e a 9x9 para tratar lesões epidérmicas.

O aparelho opera a uma potência fixa, assim como a frequência de tiros de 2Hz (2 tiros por segundo). Já a fluência varia conforme a duração do pulso. As fluências máximas para o pulso curto (1ms), médio (1,5ms) e longo (2ms) são 800mj/cm², 1000mj/cm² e 1400mj/cm² respectivamente.

4.2.2 Definição do protocolo

Estudos iniciais com uma sessão de tratamento com lasers fracionados mostraram resultados satisfatórios para melhorar a textura da pele e clarear as manchas

induzidas pela exposição solar crônica, mas insatisfatórios para atenuar as rugas mais profundas, necessitando de múltiplos tratamentos, em média seis, para uma melhora mais evidente (74). Algumas medidas foram tomadas para tentar alcançar o máximo de efeito possível em apenas uma única sessão, como por exemplo utilizar a ponteira 7x7 com altas energias e múltiplas passadas na região alvo (75).

Quanto maior o número de passadas, maior é a densidade de zonas de tratamento microscópicas e, portanto, menos fracionado se torna o procedimento, podendo aumentar o tempo de cicatrização e os riscos de complicações. A primeira aplicação desse laser fracionado microablativo causa uma injúria térmica na pele de aproximadamente 20% de ablação e 30% de coagulação, sendo que em cada passada adicional há um incremento de aproximadamente 10% de ablação da superfície cutânea associada a um aumento de 15% de coagulação dos tecidos adjacentes (figura 6) (76).

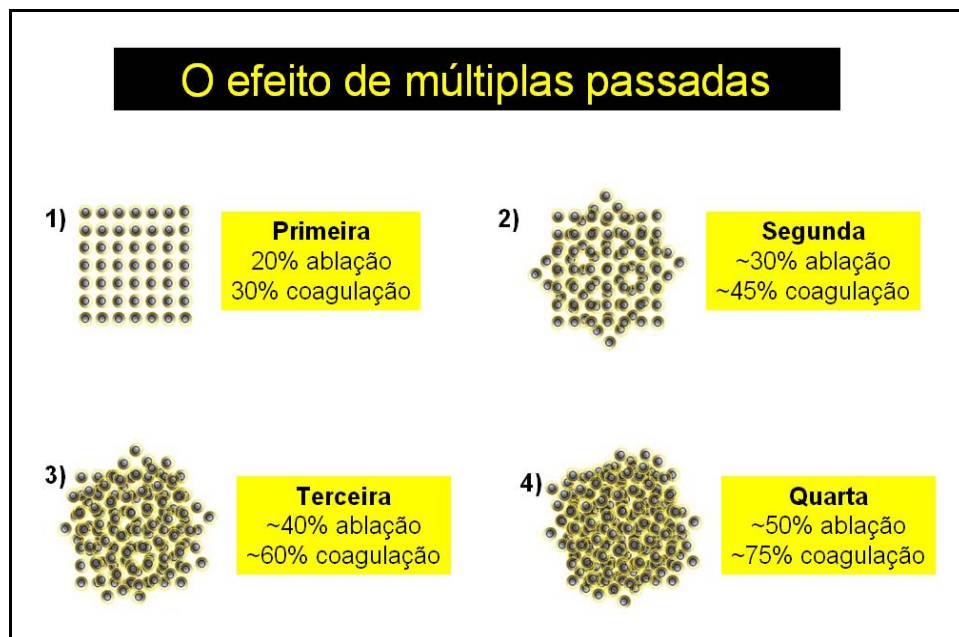


Figura 6 - Características da lesão térmica cutânea de acordo com o número de passadas

Na região perioral, a redução das rugas foi maior com o aumento do número de passadas e de pulsos estacionários (3). Então, outra forma de melhorar os resultados para as ríides seria aumentar o número de pulsos estacionários em cada ponto de aplicação do laser. A figura 7 mostra que quanto maior o número de tiros estacionários maior é a profundidade da lesão térmica, podendo chegar a 750µm no sexto tiro consecutivo, considerando a zona de ablação e de coagulação. Seria ótimo para o tratamento das rugas mais profundas, sem perder a característica fracionada e suas vantagens (76).

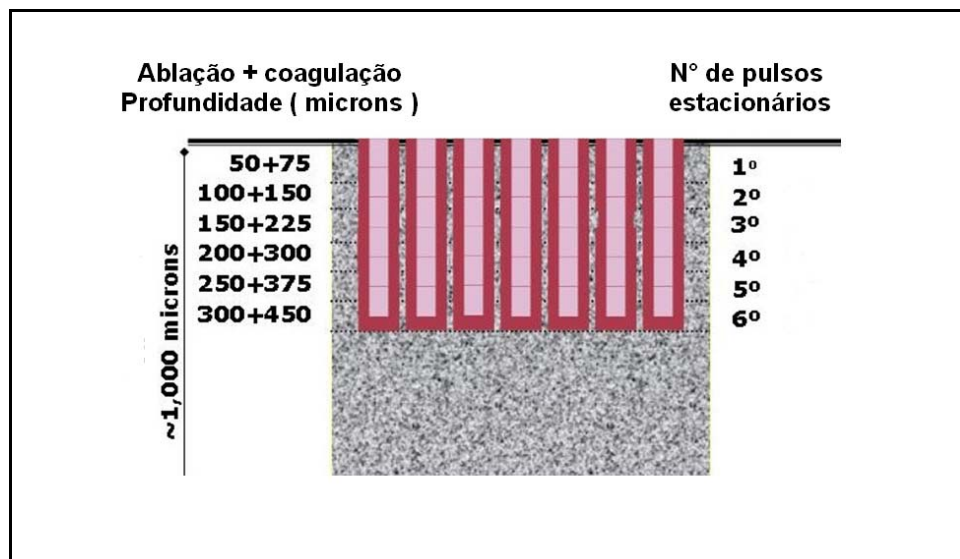
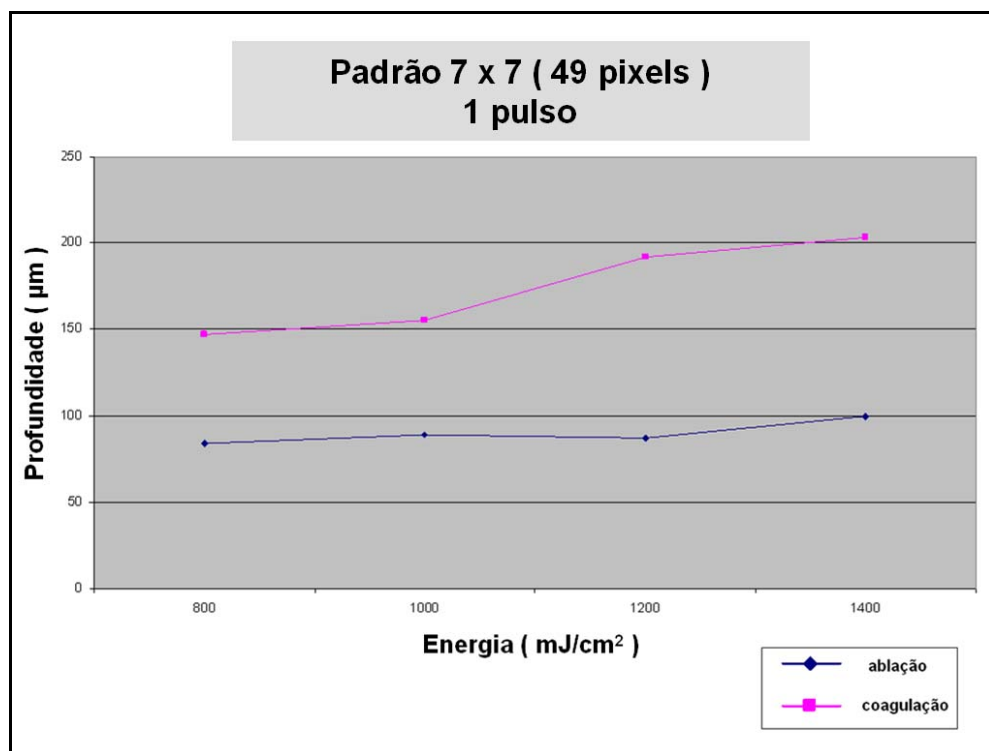


Figura 7 - Relação do Número (Nº) de pulsos estacionários com a profundidade da lesão térmica cutânea em microns

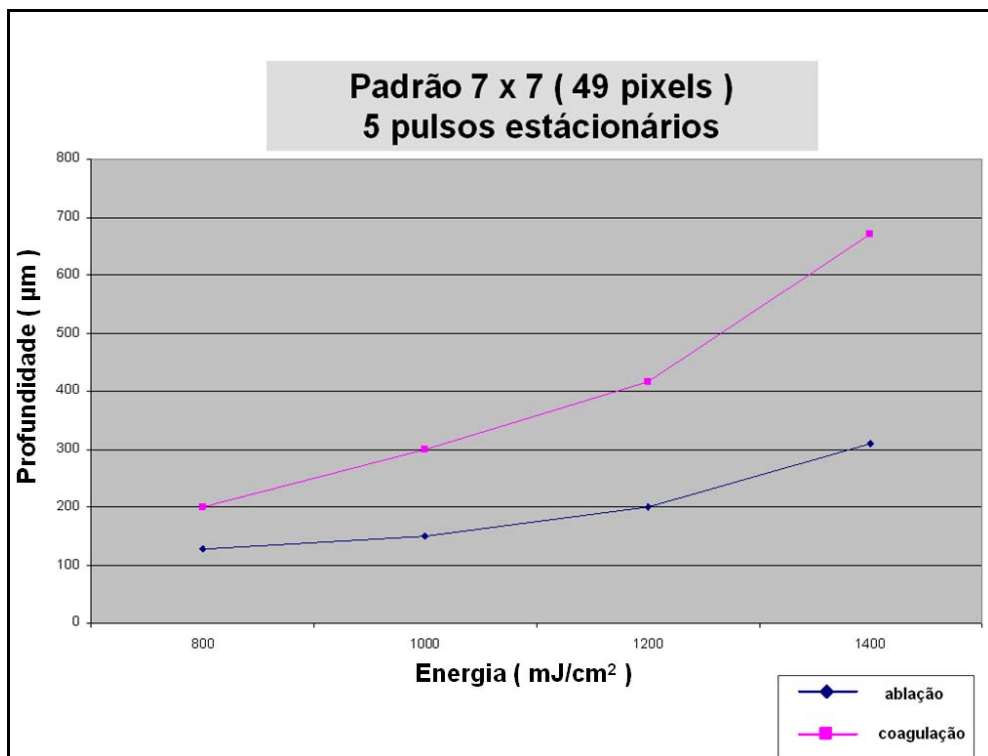
Realizamos um estudo piloto histopatológico comparando a profundidade da lesão térmica nas diferentes fluências e número de tiros estacionários, ainda para publicação. Considerando a ponteira 7x7 e apenas um pulso, quanto maior a fluência maior é a profundidade da ablação e coagulação cutânea. Na fluência máxima de $1400\text{mJ}/\text{cm}^2$ a coagulação dos tecidos atinge uma profundidade de pouco mais de $200\mu\text{m}$, como mostra o gráfico 1.

Gráfico 1 - Relação entre profundidade da lesão térmica com energia empregada utilizando a ponteira de 49 pixels e 1 pulso



Quando foram realizados cinco pulsos estacionários com a mesma ponteira, utilizando a máxima fluência de $1400\text{mJ}/\text{cm}^2$, a profundidade de coagulação aumentou para quase $700\mu\text{m}$ (gráfico 2), ratificando os dados da figura 7.

Gráfico 2 - Relação entre profundidade da lesão térmica com energia empregada utilizando a ponteira de 49 pixels e 5 pulsos estacionários



Múltiplos pulsos estacionários não permitem que a epiderme esfrie, acumulando calor que se propaga para a derme. A ablação tecidual não é a única responsável pela neoformação de colágeno, mas também a necrose celular e a desnaturação do colágeno causado pela difusão do calor na derme (77).

Com base nos resultados desse estudo histológico piloto, foi montado um protocolo para o rejuvenescimento perioral com o Erbium-YAG fracionado de

2940nm, tentando maximizar sua eficácia para o tratamento das rugas profundas, com curto período de recuperação, sem alterar seu perfil de segurança.

Além disso, a combinação de altas energias com baixa densidade de pixels tem menor risco de hiperemia pós-inflamatória do que o uso de baixas energias com alta densidade de pixels (78).

Dessa forma, foi escolhida a ponteira 7x7, com 49 pixels, para a realização do protocolo, utilizando a fluência máxima de 1400mj/cm², pulso longo, a uma frequência de 2 pulsos por segundo, com seis pulsos estacionários em cada ponto de tratamento. Uma única passada em toda região perioral.

4.2.3 Tratamento

Não foi preconizado nenhum preparo da pele pré-laser e não foram prescritas medicações para a profilaxia anti-herpética, justamente para avaliar as incidências de hiperemia pós-inflamatória e erupção herpética.

O fabricante do aparelho refere que o tratamento pode ser realizado sem o uso de anestésicos em todos os seus programas (75), pois é muito bem tolerado. Especificamente a região perioral apresenta índice de dor ≤ 3 , considerando uma escala de 0 a 10. Este índice não aumenta com passadas adicionais do laser (3), por isso não houve preocupação com a analgesia antes, durante e pós procedimento.

A região perioral foi higienizada com água e sabonete comum. É importante secar bem a pele antes de iniciar a aplicação do laser, pois como o alvo é a água, se a pele ainda estiver úmida o tratamento fica superficial.

Os olhos da paciente foram protegidos com um protetor ocular de metal. O pesquisador e a equipe assistente também se protegeram com óculos para o

comprimento de onda específico, luvas, máscaras e gorros descartáveis. Durante a aplicação do laser, a fumaça que se formava pela ablação da pele foi constantemente removida por um aspirador.

O procedimento foi realizado com a ponteira 7x7, fluência de 1400mj/cm², pulso longo, frequência de 2Hz, seis pulsos estacionários em cada área de 11mm², cobrindo toda a região perioral em uma única passada, dos orifícios nasais até a borda inferior do mento, poupando o vermelhão labial e como limites laterais os sulcos nasogenianos e labiomentonianos.

Uma área de 2cm² pré-auricular direita a 1 cm do tragus também foi tratada em todas as pacientes, com os mesmos parâmetros da região perioral, para posterior biópsia pós-laser, onde a cicatriz fica bem menos aparente comparando com a região ao redor da boca.

Os cuidados pós-laser limitaram-se a higiene local com água e sabonete, hidratação com vaselina líquida e uso de protetor solar FPS 30 por pelo menos 1 mês.

4.2.4 Documentação clínica fotográfica

Todas as fotos foram realizadas com uma câmera Sony Mavica de 5,0 megapixels com os parâmetros padronizados. Um suporte facial fixo garantiu a mesma distância entre a câmera e o paciente. Foram realizadas fotos frontais e com um ângulo de 45° da região perioral antes do laser e nos retornos de controle em 3, 7, 14 e 28 dias.

4.2.5 Avaliação clínica

Logo após a aplicação do laser, a dor do procedimento foi avaliada pela escala visual de faces de Wong-Baker, a fim de quantificar o grau de tolerância ao tratamento (79).

Sendo: 0 = sem dor, 2 = dor leve, 4 = dor moderada, 6 = dor forte, 8 = dor intensa, 10 = dor insuportável (figura 8). Lembrar que não foi utilizado nenhum recurso de analgesia pré, intra e pós laser.

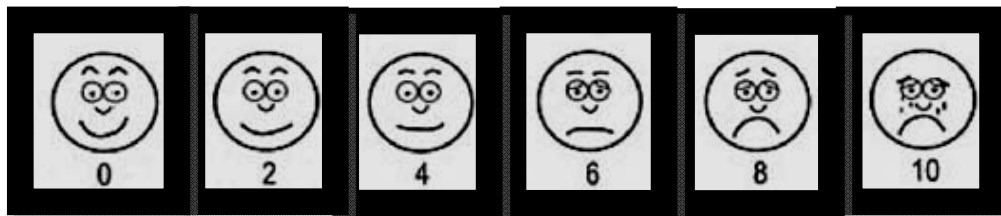


Figura 8 - Escala visual de faces de Wong-Baker para dor

Os resultados clínicos foram avaliados por um dermatologista especialista em cosmiaatria não vinculado ao estudo, através da comparação de fotos pré e após 28 dias do tratamento.

As rugas periorais de todas as pacientes foram classificadas antes e após 28 dias do laser por esse observador, seguindo a classificação de Baker de 1998, que leva em consideração os seguintes critérios: profundidade, localização e quantidade (80) (tabela 3). Rugas tipo I são superficiais, acometendo 1/3 a metade do lábio superior, em quantidade menor ou igual a 8. Rugas tipo II são aquelas de profundidade moderada, ocupando mais de 2/3 do lábio superior com número entre 9 e 15. Já as rugas tipo III são numerosas (igual ou maior que 16), profundas e estão presentes em todo lábio superior, inferior e mento.

Tabela 3 - Classificação de Baker para rugas estáticas

Tipo	Profundidade	Localização	Número de rugas
I	superficiais	1/3 a 1/2 do lábio superior	≤ 8
II	moderadas	Mais de 2/3 do lábio superior	9 a 15
III	profundas	Lábios superior e inferior, mento	≥ 16

A aparência das rugas periorais após 28 dias do tratamento ainda foi avaliada pelo observador cego, desta vez seguindo uma escala subjetiva de intensidade de melhora: melhora importante, moderada, leve, nenhuma melhora ou piora.

Uma outra escala, Global Aesthetic Improvement Scale (GAIS – tabela 4), que se refere a melhora estética global da região tratada também foi avaliada após 28 dias da aplicação do laser, apresentando os seguintes índices: melhora muito boa, quando o resultado cosmético do laser é ótimo; boa melhora, quando há uma melhora marcante da aparência, mas uma complementação se faz necessária para um toque final; leve melhora, quando um re-tratamento é necessário mesmo com uma certa melhora da aparência; sem melhora, quando a aparência após o tratamento é igual ao original; e piora, quando a aparência é pior que a original (81).

Tabela 4 - Escala de melhora estética global (GAIS)

Índice	Descrição
Muito boa melhora	Resultado cosmético ótimo do laser
Boa melhora	Melhora marcante da aparência, mas uma complementação seria bom para um toque final
Leve melhora	Melhora da aparência, mas um re-tratamento é indicado
Sem melhora	A aparência pós laser é igual à original
Piora	A aparência é pior do que a condição original

Todas as complicações ou eventos adversos referentes ao tratamento foram registrados em todos os retornos de controle (3, 7, 14 e 28 dias pós-laser). Foram avaliados os seguintes sinais e sintomas: ardor/dor, eritema, edema, ressecamento, descamação, prurido, hipocromia, hiperpigmentação, cicatriz, erupção acneiforme, erupção herpética e queilite angular.

No retorno de 28 dias, o grau de satisfação das pacientes em relação ao resultado do procedimento foi avaliado em: insatisfeita, pouco satisfeita, satisfeita ou muito satisfeita.

Para complementar o grau de satisfação as seguintes perguntas foram realizadas, com o direito de resposta sim ou não.

- ❖ Recomendaria o laser para outras pessoas?
- ❖ Repetiria o tratamento se fosse necessário?
- ❖ Sente-se mais atraente?
- ❖ Melhorou sua autoestima?

4.2.6 Anátomo-patologia

Biópsia da pele pré-auricular esquerda (1cm do tragus) foi colhida previamente ao tratamento em todas as pacientes como controle. Após 3 dias do tratamento foi colhida biópsia da pele pré-auricular direita (1cm do tragus) de 5 pacientes escolhidas aleatoriamente. Após 7 dias foi colhida biópsia da pele pré-auricular direita de outras 5 pacientes, após 14 dias de mais 5 pacientes e após 28 dias das 5 pacientes restantes, ou seja, todas foram biopsiadas 2 vezes (uma em cada lado) em tempos diferentes, com “punch” descartável de 3mm, sob anestesia local infiltrativa com lidocaína a 2% com epinefrina 1: 50000.

Todas as amostras foram coradas pela hematoxilina/eosina e apenas as amostras colhidas 1 mês após o tratamento foram coradas com o Picosírius para evidenciar as fibras colágenas e avaliar se houve neocolagênese significativa quando comparadas com o controle pré-laser.

Foi realizada também a reação de imuno-histoquímica para células de Langerhans, utilizando o anticorpo monoclonal CD1a em todas as biópsias conforme descrito abaixo:

Cortes histológicos de 4µm de espessura foram obtidos a partir de material embebido em parafina e colhidos em lâminas previamente preparadas com solução adesiva de 3 amino-propyltriethoxy-silane a 2% (Sigma Chemical Company, Saint Louis, MO/USA, código A3648). A seguir, os cortes histológicos foram desparafinizados em dois banhos de xilol a 56°C durante 30 minutos, e à temperatura ambiente durante 20 minutos. Posteriormente, foram hidratados em sequência decrescente de etanol (absoluto, 95% e 70%) e água corrente durante cinco minutos cada.

Em seguida, as lâminas foram submetidas ao bloqueio de peroxidase endógena realizado em câmara escura com seis incubações em água oxigenada 3% por 10 minutos cada. As lâminas foram lavadas em água corrente e água destilada por cinco minutos cada e submersas em solução salina tamponada (PBS) pH 7.4.

Posteriormente, foi feito o bloqueio de proteínas inespecíficas do tecido com incubação em solução de leite desnatado (Molico, Nestlé®) a 10% durante 30 minutos à temperatura ambiente.

As lâminas foram incubadas com o anticorpo primário monoclonal anti-CD1a (DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA, código M3571) diluído a 1:100 em BSA fração V (SERVA. 1930) 1% acrescida de azida sódica 0,1% em tampão PBS pH 7.4, “overnight” a 4°C.

Após serem lavadas em PBS pH 7.4, por duas vezes, durante cinco minutos cada, as lâminas foram incubadas com anticorpo secundário anti-IgG/IgM (mouse/rabbit) - “Advance™ HRP Link” (Advance™ system-HRP, DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA, código K4068) pronto para uso em câmara úmida durante 30 minutos a 37°C.

A seguir, as lâminas foram novamente lavadas em PBS pH 7.4 por duas vezes e incubadas com o polímero marcado com peroxidase - “Advance™ HRP Enzyme” (Advance™ system-HRP, DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA, código K4068) pronto para uso em câmara úmida durante 30 minutos a 37°C.

Após o procedimento de lavagem em PBS, as reações foram visualizadas através do cromógeno diaminobenzidina 0,03% (3,3'-diaminobenzidine, SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO/USA, código D5637) acrescida de 1,2 ml de água oxigenada 3%. A intensidade da cor foi controlada ao microscópio óptico através do controle positivo

(pele normal) que acompanhou a reação. O controle negativo da reação foi obtido através da omissão do anticorpo primário, o qual foi substituído por PBS.

As lâminas foram lavadas em água corrente por cinco minutos, contracoradas com Hematoxilina de Harris por 10 segundos. A seguir foram lavadas em água corrente, e secas à temperatura ambiente.

A montagem das lâminas foi feita com resina Permount (FISHER Scientific, Fair Lawn, NJ/USA, cód. SP15-100).

A técnica imuno-histoquímica para a demonstração dos TLRs 2, 3 e 9 também foram realizadas em todas as lâminas e seguiram os seguintes passos:

Cortes histológicos de 4 μ m de espessura foram obtidos a partir de material embebido em parafina e colhidos em lâminas previamente preparadas com solução adesiva de 3 amino-propyltriethoxy-silane a 2% (Sigma Chemical Company, Saint Louis, MO/USA, código A3648). A seguir, os cortes histológicos foram desparafinizados em dois banhos de xilol a 56°C durante 30 minutos, e à temperatura ambiente durante 20 minutos. Posteriormente, foram hidratados em sequência decrescente de etanol (absoluto, 95% e 70%) e água corrente durante cinco minutos cada.

O bloqueio de peroxidase endógena, usado nas reações para marcação com os anticorpos anti-TLR 3, foi feito em câmara escura com seis incubações em água oxigenada 3% por 10 minutos cada. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água corrente e água destilada por cinco minutos cada e submersas em solução salina tamponada (PBS) pH 7.4.

Posteriormente, as lâminas foram submetidas a tratamento para exposição dos sítios antigênicos em calor úmido (panela a vapor) no tampão TRIS/EDTA 10mM/1mM pH 9.0, durante 25 minutos, após o aquecimento do tampão a 95°C. A

seguir as lâminas foram mantidas em repouso à temperatura ambiente por 20 minutos para resfriamento do tampão.

As lâminas foram lavadas em água corrente e água destilada por cinco minutos cada e submersas em PBS pH 7.4.

A seguir, foi feito o bloqueio de proteínas inespecíficas do tecido com incubação em solução de leite desnatado (Molico, Nestlé®) a 10% durante 30 minutos à temperatura ambiente.

Com exceção da reação para a expressão de TLR 3, que foi visualizada através do cromógeno diaminobenzidina 0,03% (3,3'-diaminobenzidine, SIGMA Chemical Company, Saint Louis, MO/USA, código D5637) acrescida de 1,2 ml de água oxigenada 3%, todas as reações realizadas foram visualizadas através do cromógeno "Permanent Red" 0,13% (DAKO, Carpinteria, CA, USA, código K0640) acrescido de 40µl de levamisole (DAKO, Carpinteria, CA, USA, código X3021).

A intensidade da cor foi controlada ao microscópio óptico através dos controles positivos que acompanharam as reações. Os controles positivos aos antígenos estudados foram: pele normal para células com expressão de TLR 2 e molusco contagioso para células com expressão de TLR 3 e TLR 9. Os controles negativos das reações foram obtidos através da omissão do anticorpo primário, que foi substituído por PBS.

As lâminas foram lavadas em água corrente por cinco minutos, contracoradas com Hematoxilina de Harris por 10 segundos. A seguir foram lavadas em água corrente, e secas à temperatura ambiente.

A montagem das lâminas foi feita com resina Permound (FISHER Scientific, Fair Lawn, NJ/USA, código SP15-100).

As lâminas foram incubadas com os anticorpos primários monoclonal anti-TLR 2 (Santa Cruz Biotechnology® Inc., Santa Cruz, CA, USA, código sc-10739) diluído a 1:50, monoclonal anti-TLR 3 (Imgenex, San Diego, CA, USA, código IMG-315A) diluído a 1:100 e monoclonal anti-TLR 9 (Imgenex, San Diego, CA, USA, código IMG-305A) diluído a 1:200 em BSA fração V 1% (SERVA. 1930) acrescida de azida sódica 0,1% em PBS pH 7.4, “over-night” a 4°C.

Para pesquisa de TLR 2 e TLR 9, após o procedimento de lavagem das lâminas por duas vezes em PBS pH 7.4 durante cinco minutos cada, seguiu-se a incubação com o anticorpo secundário anti-IgG/IgM (mouse/rabbit) (EnVision™ G2 system-AP, DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA, código K5355) pronto para uso durante 30 minutos a 37°C.

A seguir, as lâminas foram lavadas em tampão PBS pH 7.4, por duas vezes, durante cinco minutos cada e incubadas com o polímero marcado com fosfatase alcalina (EnVision™ G2 system-AP, DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA, código K5355) pronto para uso em câmara úmida durante 30 minutos a 37°C.

Para pesquisa de células com expressão de TLR 3, após lavagem do material em PBS pH 7.4, por duas vezes, durante cinco minutos cada, procedeu-se à incubação com anticorpo secundário anti-IgG/IgM (mouse/rabbit) – “Advance™ HRP Link” (Advance™ system-HRP, DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA, código K4067) pronto para uso em câmara úmida durante 30 minutos a 37°C.

A seguir, as lâminas foram lavadas em PBS pH 7.4, por duas vezes, durante cinco minutos cada e incubadas com o polímero marcado com peroxidase – “Advance™ HRP Enzyme” (Advance™ system-HRP, DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA, código K4067) pronto para uso em câmara úmida durante 30 minutos a 37°C.

4.2.7 Avaliação histomorfométrica

As lâminas coradas pelo Picrosírius foram analisadas por um microscópio de luz polarizada com objetiva de 40x e ocular de 10x para evidenciar melhor as bandas de colágeno tipo I (fibras grossas vermelho-alaranjadas) e tipo III (fibras verdes finas). As fotos de toda derme superficial de cada amostra (por exemplo, figura 9) foram capturadas por uma câmera acoplada no microscópio de luz polarizada, que passava as imagens para o programa Image-Pro Plus versão 4.5 no computador, onde foram salvas.

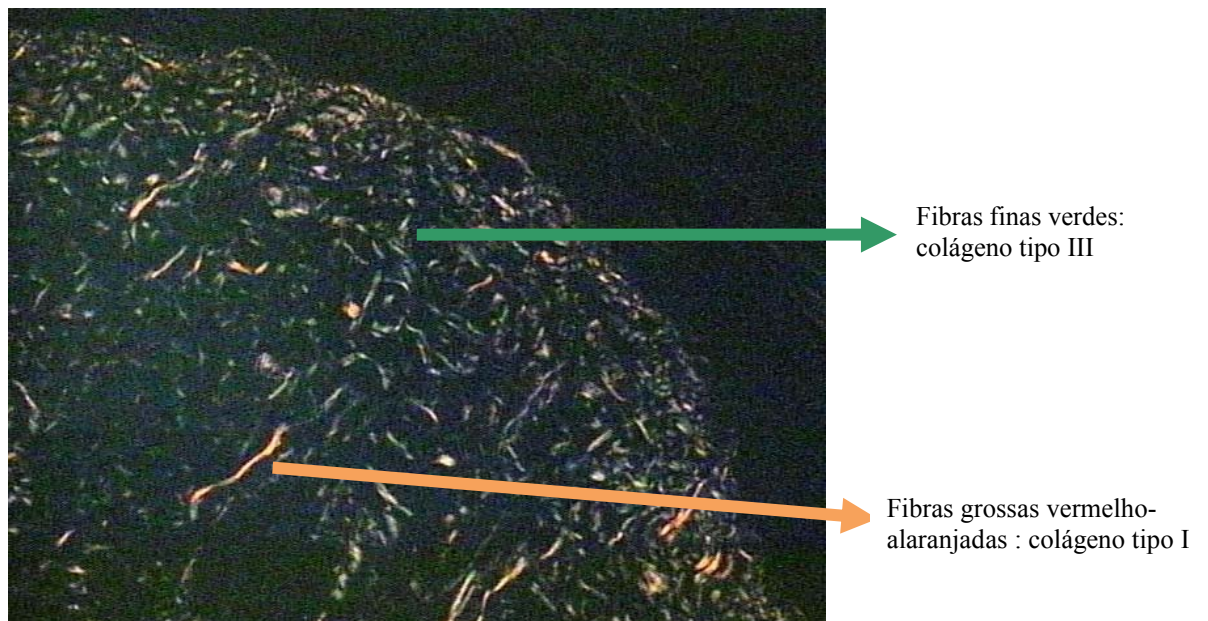


Figura 9 - Imagem da coloração de Picrosírius através da luz polarizada. Aumento 400x

Foi realizada uma média de 16,9 fotos por lâmina, sendo 2 lâminas por paciente (pré e após 1 mês de tratamento), dando um total de 169 campos analisados.

Este mesmo programa, além de fotografar, é capaz de diferenciar pela cor as imagens das fotos, calculando automaticamente a sua área total em μm^2 (SUM). Assim, tudo o que é verde corresponde às fibras de colágeno tipo III, e vermelho alaranjado às fibras de colágeno tipo I.

Primeiro, seleciona-se a área a ser analisada (figura 10), mensura-se, nesta área delimitada, a área que corresponde ao colágeno tipo I (figura 11) e III (figura 12) e posteriormente a área total (figura 13). Em cada campo foi calculada a porcentagem de colágeno tipo I e III na área demarcada pré e pós-tratamento.

Desta forma, em cada paciente foi possível calcular a média das porcentagens de cada tipo de fibra colágena pré e pós-laser, e avaliar se houve alteração dessa proporção com o tratamento.

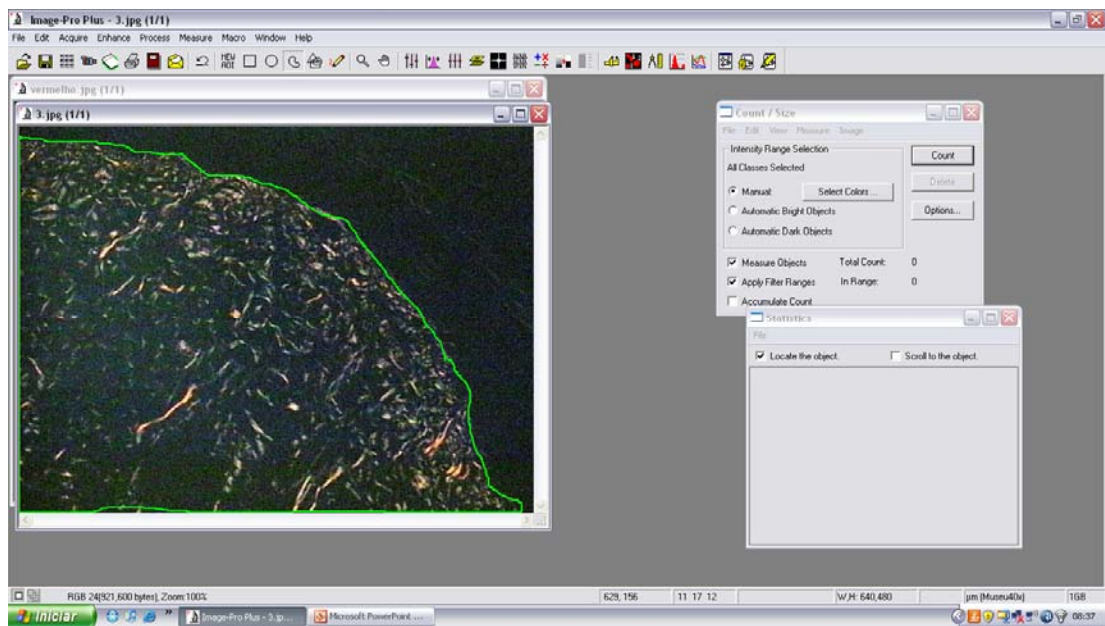


Figura 10 - Delimitação em verde da área a ser analisada, correspondente a derme superior. Aumento 400x

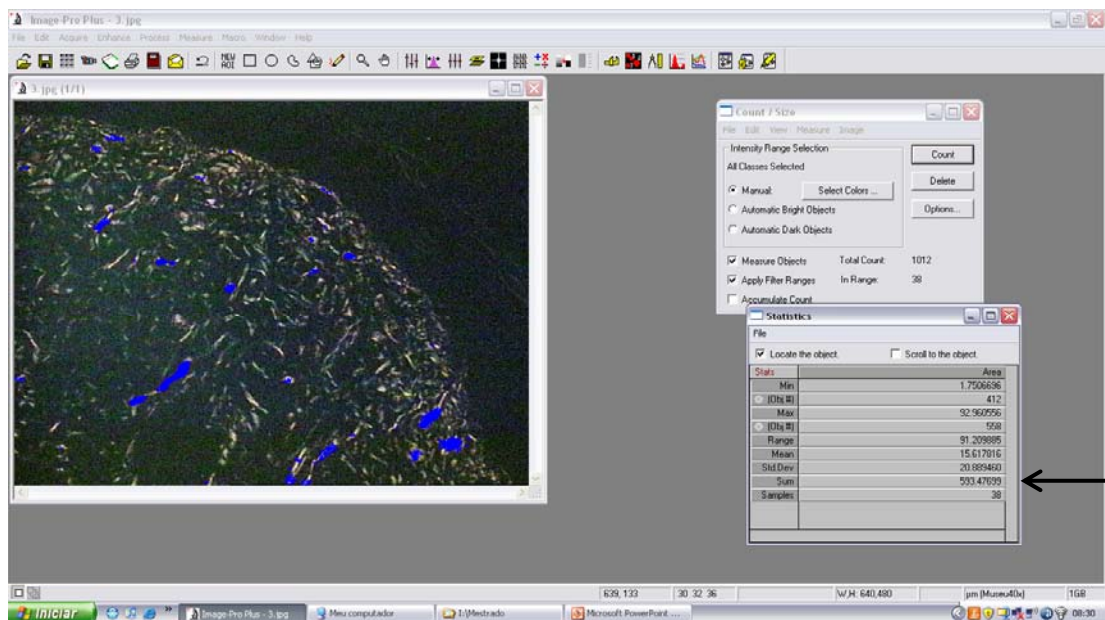


Figura 11 - Fibras grossas vermelho-alaranjadas (colágeno tipo I) destacadas em azul. Área total das fibras é calculada automaticamente pelo programa em μm^2 (seta). Aumento 400x

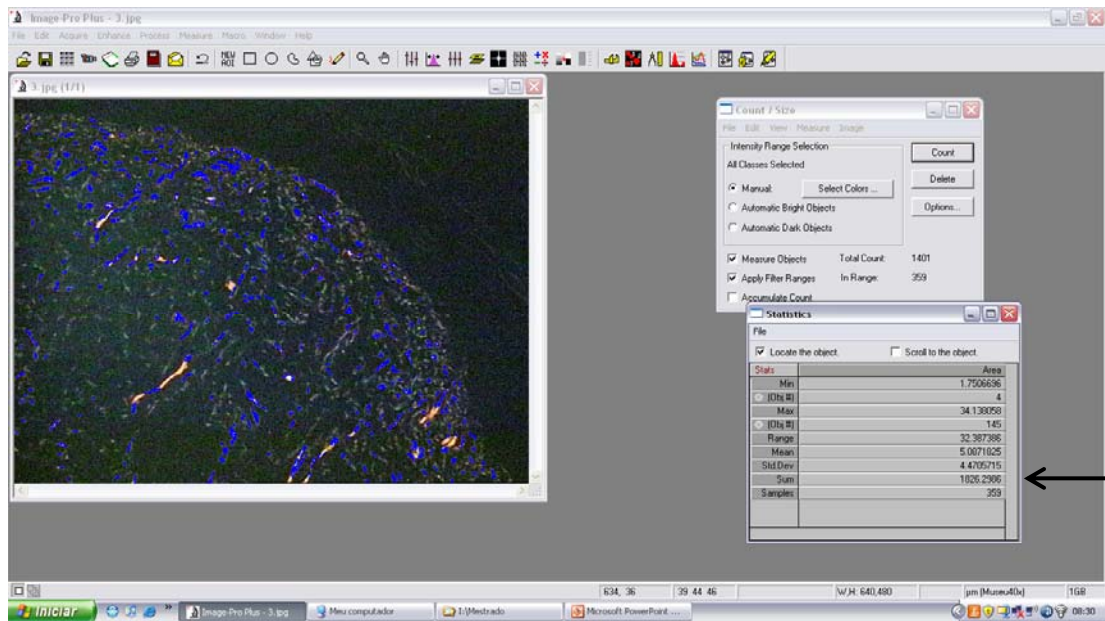


Figura 12 - Fibras finas verdes (colágeno tipo III) destacadas em azul. Área total das fibras é calculada automaticamente pelo programa em μm^2 (seta). Aumento 400x

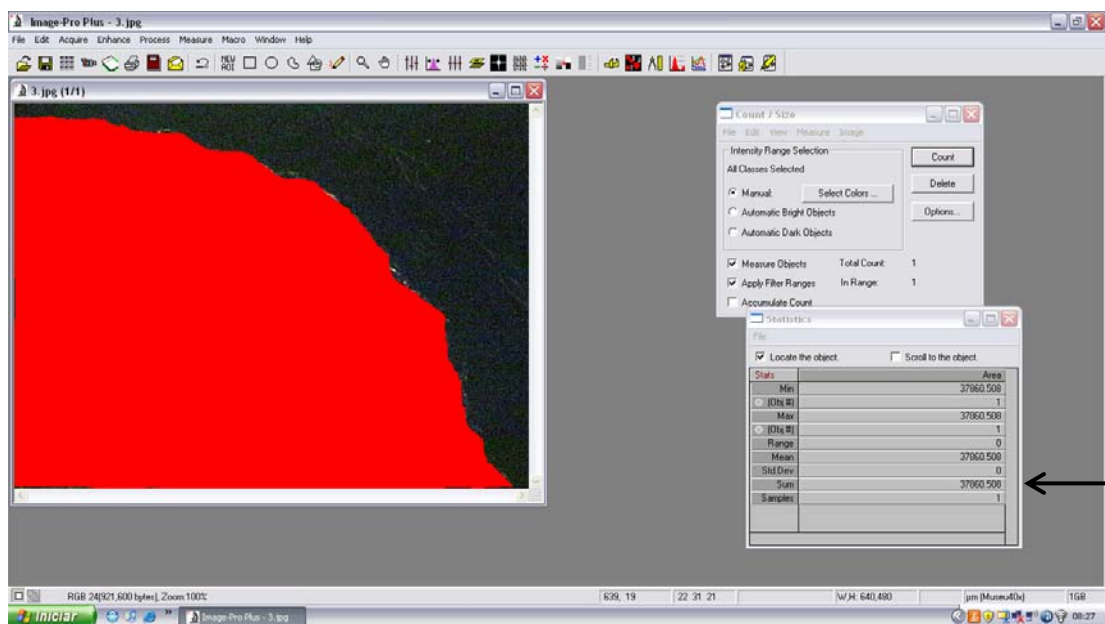


Figura 13 - Cálculo automático em μm^2 da área total analisada destacada em vermelho (seta). Aumento 400x

As fotos das lâminas coradas pelo H/E e imuno-histoquímica para CD1a, TLRs 2, 3 e 9, foram capturadas por uma câmera acoplada em um microscópio óptico comum que passava as imagens da lâmina, analisada através da lente objetiva de 20x e ocular de 10x, para o programa Image-Pro Plus versão 4.5 no computador, onde foram salvas.

Para a avaliação do CD1a todas as pacientes (20) foram biopsiadas antes do tratamento e depois, em tempo diferentes: 3 dias (5 pacientes), 7 dias (5 pacientes), 14 dias (5 pacientes) e 28 dias (5 pacientes). Uma média de 11,85 campos por lâmina foi analisada, com um total de 474 campos (2 lâminas/pessoa, 20 pacientes).

A técnica de imuno-histoquímica utilizada neste estudo cora as células de Langerhans em marrom, dando um bom contraste com o restante dos queratinócitos.

O programa Image-Pro Plus novamente foi utilizado para mensurar a área ocupada pelas células de Langerhans em toda a epiderme de cada amostra, correspondente ao seu habitat natural (Figura 14).

Em cada campo foi calculada a área em μm^2 de CD1a (figura 15) e a área total analisada (figura 16) pré e pós-tratamento. Depois calculou-se a porcentagem da área de CD1a em relação à área total antes e depois da irradiação do laser. Por fim foi possível calcular a média das porcentagens de células de Langerhans e avaliar se houve alteração dessa proporção com o tratamento.

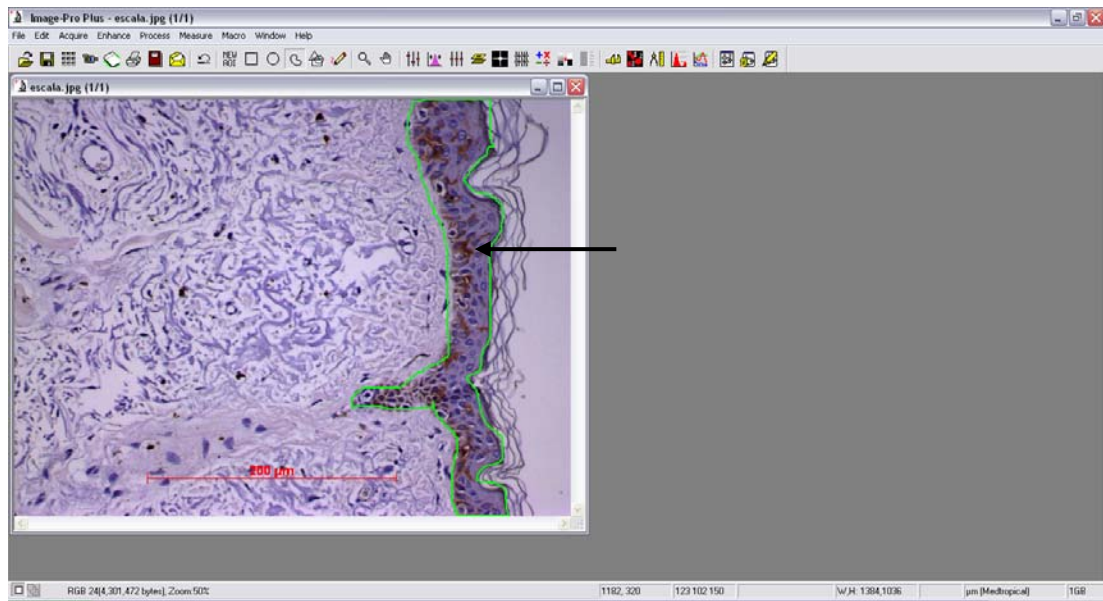


Figura 14 - Delimitação de toda epiderme (em verde) para ser analisada. Células de Langerhans coradas em marrom pela imuno-histoquímica (seta). Aumento 200x

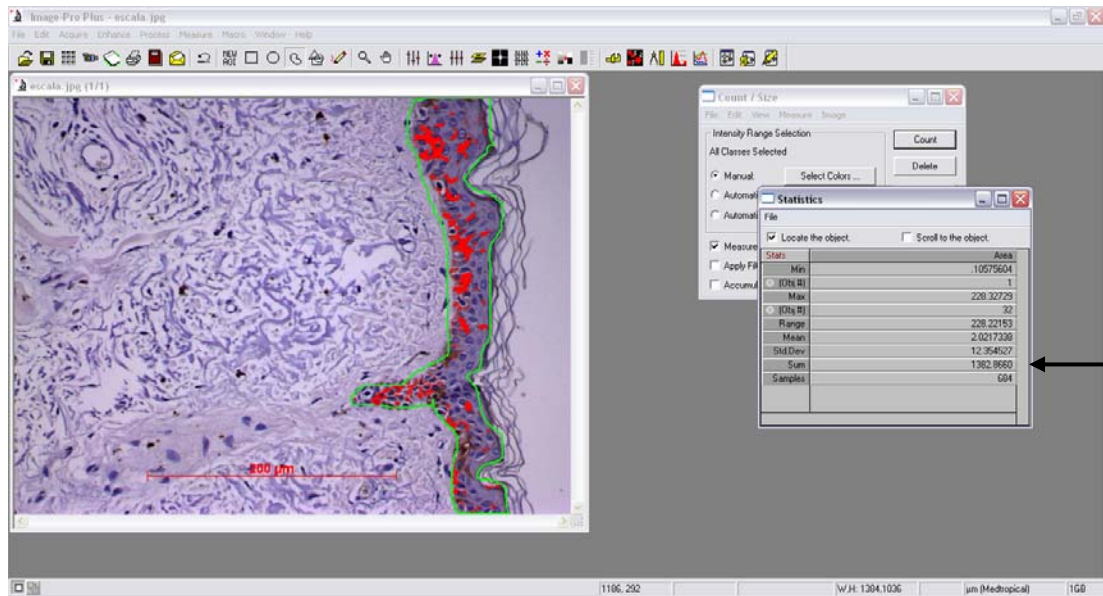


Figura 15 - Células de Langerhans destacadas em vermelho para o cálculo da sua área total em μm^2 (seta). Aumento 200x

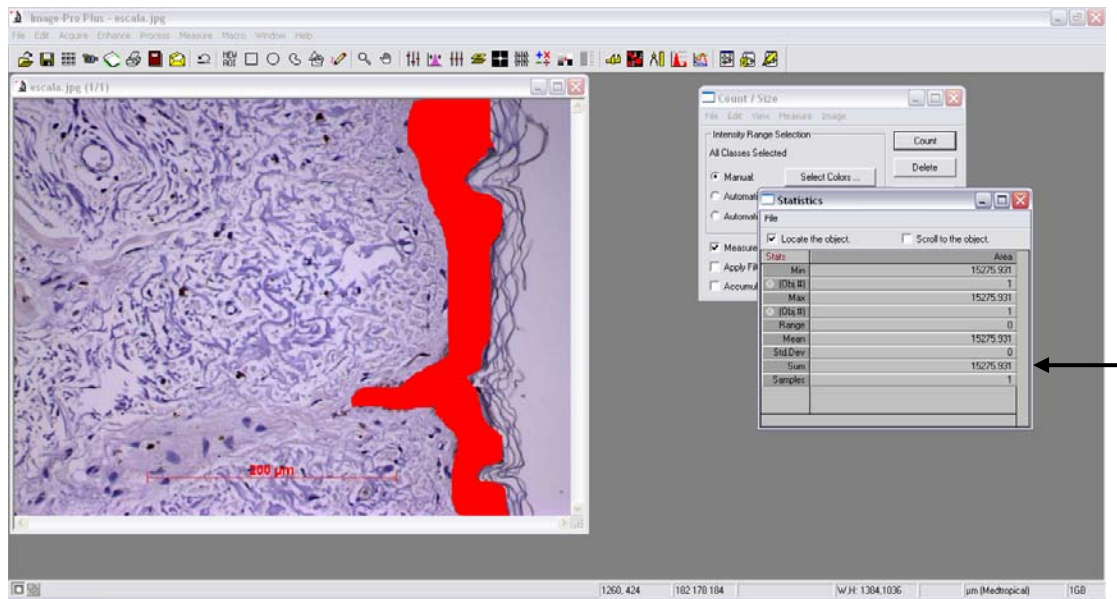


Figura 16 - Cálculo da área total da epiderme analisada em μm^2 (seta). Aumento 200x

Para avaliação dos TLRs na epiderme, o programa Image Pro Plus foi utilizado de forma semelhante ao CD1a, sendo que as cores evidenciadas pela técnica de imuno-histoquímica utilizada neste estudo foram: vermelho para TLR 2 (Figura 17) e 9 (Figura 18) e marrom para TLR 3 (Figura 19).

Foram analisados em média 11 campos por lâmina, 22 por paciente, 440 por receptor, totalizando 1320 campos.

Em cada campo foi calculada a área de cada TLR e a área total da epiderme analisada em μm^2 pré e pós-tratamento. Depois foi medida a porcentagem da área do TLR em relação a área total, antes e depois da irradiação do laser, para finalmente fazer a média das porcentagens do TLR e avaliar se houve alteração dessa proporção com o tratamento.

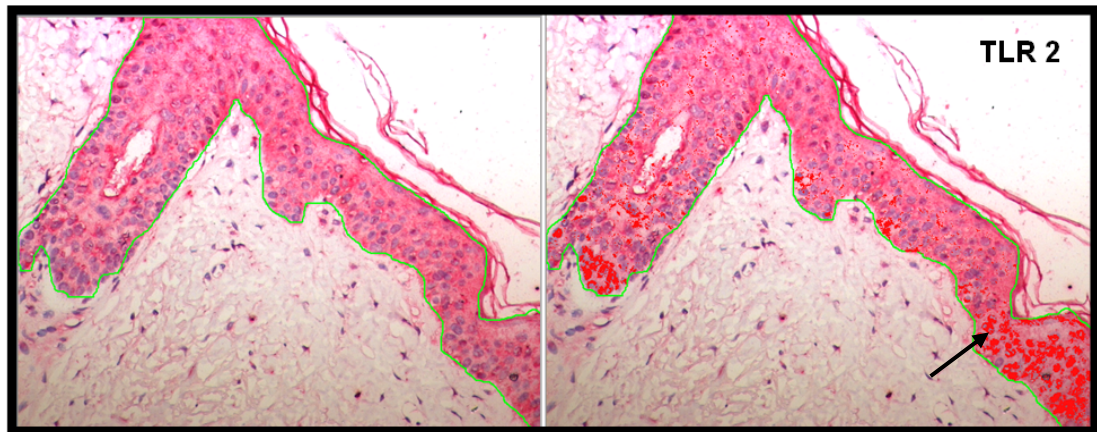


Figura 17 - Imuno-histoquímica para TLR 2 com expressão na epiderme destacada em vermelho (seta). Aumento 200x

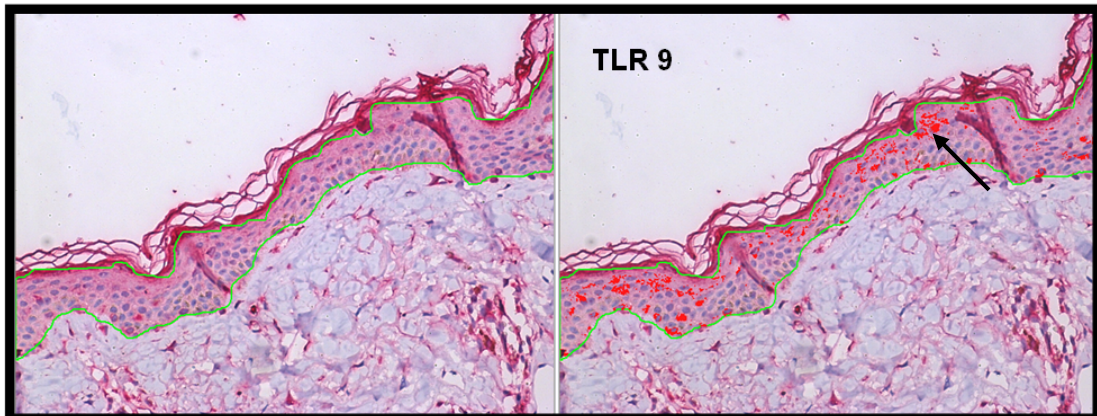


Figura 18 - Imuno-histoquímica para TLR 9 com expressão na epiderme destacada em vermelho (seta). Aumento 200x

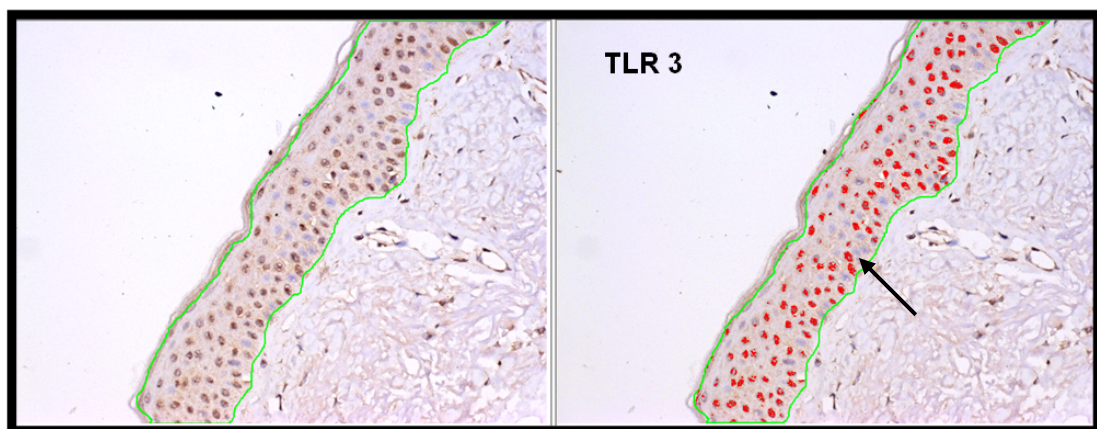


Figura 19 - Imuno-histoquímica para TLR 3 com expressão na epiderme destacada em vermelho (seta). Aumento 200x

4.2.8 Análise estatística

Para a realização da análise estatística foi utilizado o software GraphPad Prism[®] versão 5.00. Dados de 20 pacientes do sexo feminino submetidas ao tratamento com laser foram considerados para análise estatística.

Os principais valores apresentados neste estudo foram:

- ❖ Valores médios da porcentagem (%) de CD1a pré e pós 3, 7, 14 e 28 dias do tratamento com laser.
- ❖ Valores médios da porcentagem (%) de TLRs 2, 3 e 9 pré e pós 3, 7, 14 e 28 dias do tratamento com laser.
- ❖ Valores médios da porcentagem (%) de fibras colágenas tipo III pré e pós 28 dias do tratamento com laser.
- ❖ Valores médios da porcentagem (%) de fibras colágenas tipo I pré e pós 28 dias do tratamento com laser.

Reação de Imuno-histoquímica

Os valores de CD1a, TLRs 2, 3 e 9 foram medidos nas pacientes pré e pós-tratamento, sendo que 4 grupos de 5 pacientes diferentes se formaram para coleta de informações a 3, 7, 14 e 28 dias.

A comparação entre os dados obtidos pré e pós-tratamento foi realizada por meio do teste não-paramétrico de *Kruskal-Wallis* (ou análise de variância por postos), que compara 3 ou mais grupos de uma amostra com distribuição livre, e pós-teste de

Dunn, que mostra onde se deu significância entre os dados. Foram considerados níveis de significância de 5% ($p < 0,05$).

O teste de *Kruskal-Wallis* primeiramente converte os dados em postos, o que conduz a uma ordenação dos dados. Nossa hipótese nula é que todos os grupos vêm da mesma população.

A estatística não-paramétrica é uma ferramenta muito útil na análise de dados e não exige as suposições de normalidade da variável, nem homogeneidade de variâncias entre os tratamentos. É caracterizado como teste livre de distribuição, ou seja, a distribuição teórica populacional dos dados

não precisa ser estimada pelas médias ou variâncias amostrais para sua correta aplicação.

Quando se detecta diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de *Kruskal-Wallis*, usualmente são efetuadas comparações múltiplas envolvendo todos os pares de tratamentos. O teste de *Dunn* pode ser aplicado para tal finalidade, sendo verificado frequentemente na literatura científica e bem descrito em obras de estatística.

Coloração de Picrosírius

Os valores das fibras colágenas coradas pelo Picrosírius somente foram medidos em 5 pacientes antes e após 28 dias da aplicação do laser.

Devido a esse número pequeno de casos optou-se por usar um teste não-paramétrico de comparação de grupos dependentes, o teste de *Wilcoxon*. Este teste leva em consideração a magnitude da diferença de cada par e foi considerado estatisticamente significativo valores de $p < 0,05$.

5 Resultados

70% das pacientes tiveram sua cor de pele classificada como tipo III de Fitzpatrick, 15% tipo II e 15% tipo IV (gráfico 3). A idade variou de 48 a 73 anos com média de 58,95 anos. A maioria estava no grupo de 51 a 60 anos (gráfico 4).

Gráfico 3 - Distribuição das pacientes segundo classificação de Fitzpatrick

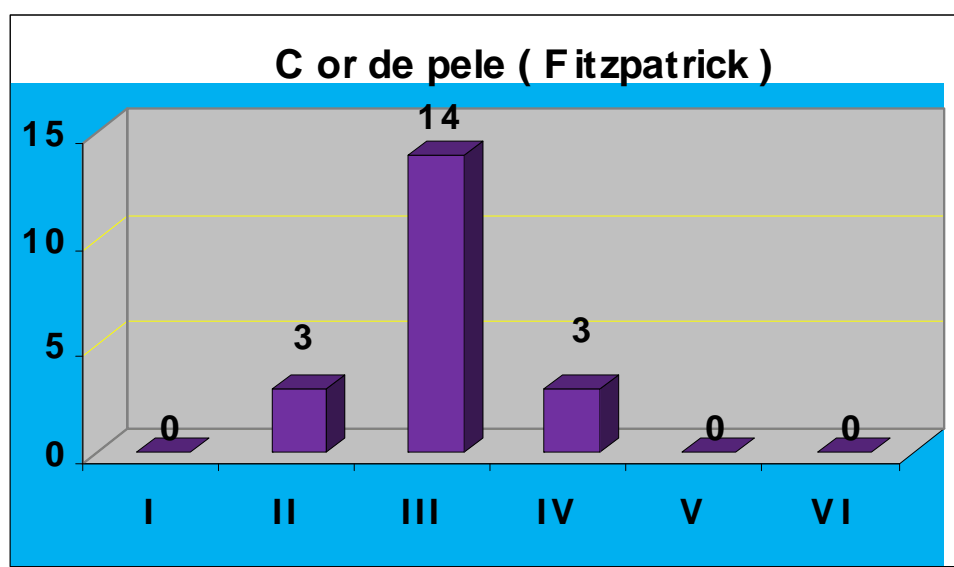
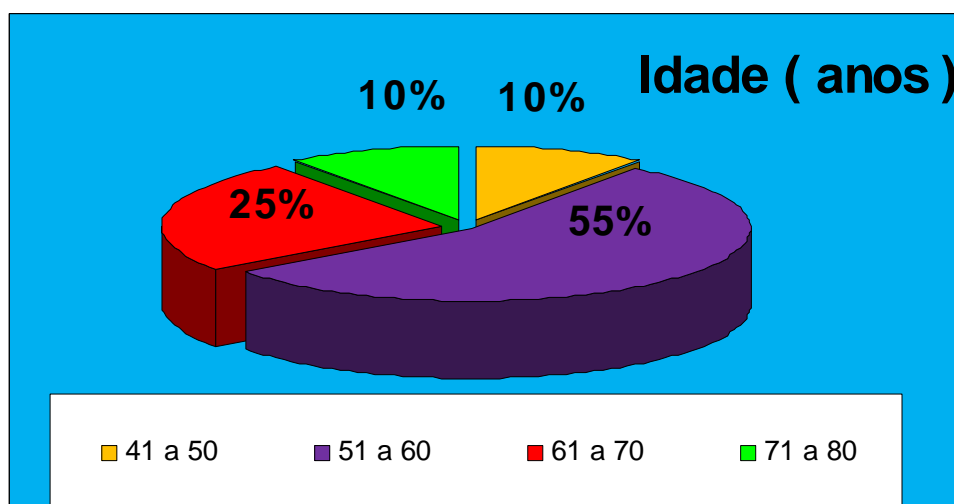


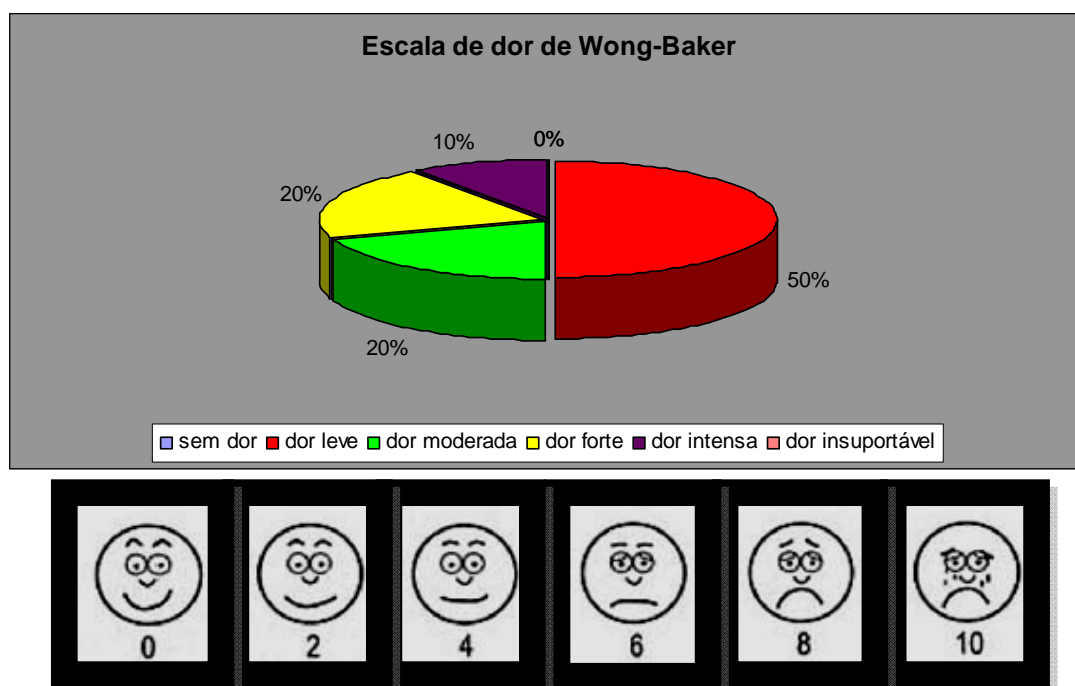
Gráfico 4 - Distribuição das pacientes segundo a idade



A avaliação da dor do procedimento foi feita através da escala visual de faces de Wong-Baker. 50% referiram dor leve, 20% dor moderada, 20% dor forte e 10% intensa. Os extremos da escala, indolor ou dor insuportável não foram citados (gráfico 5).

70% das pacientes sentiram dor leve a moderada, mesmo não realizando analgesia pré, intra ou pós-laser.

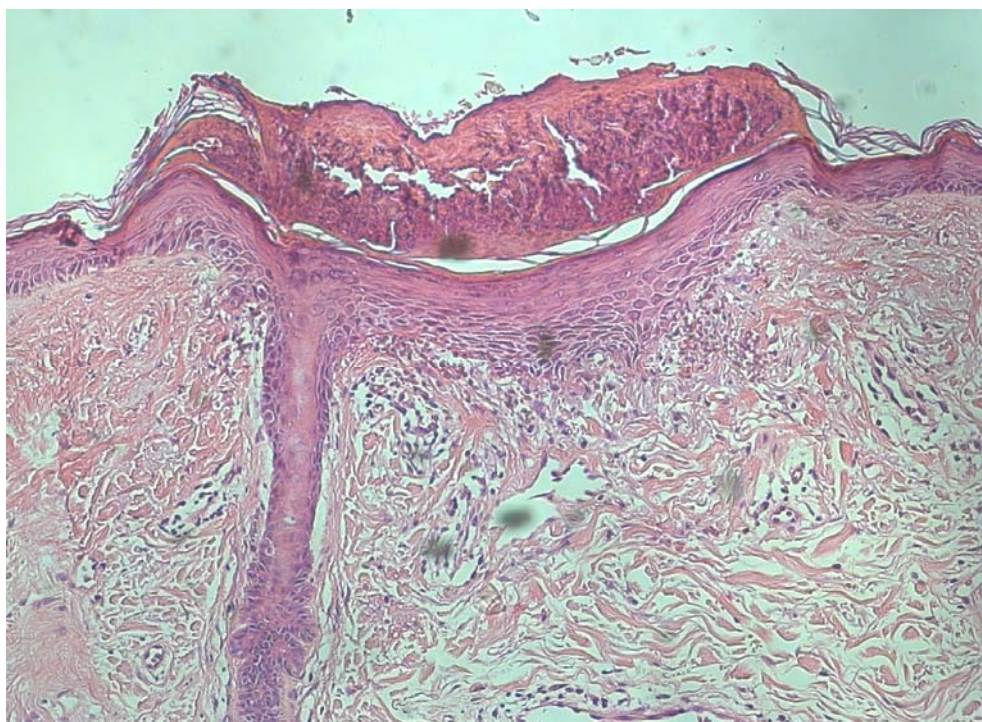
Gráfico 5 - Avaliação da dor do procedimento segundo escala de Wong-Baker.



5.1 Evolução anátomo-patológica pós-laser

Em 3 dias a epiderme já estava reepitelizada, com crostícula aderida na sua superfície, chamada de debris necrótico epidérmico microscópico, composto por restos celulares da epiderme, derme, melanina e elastina. A epiderme ainda apresentava sinais de vacuolização e lâmina basal alterada.

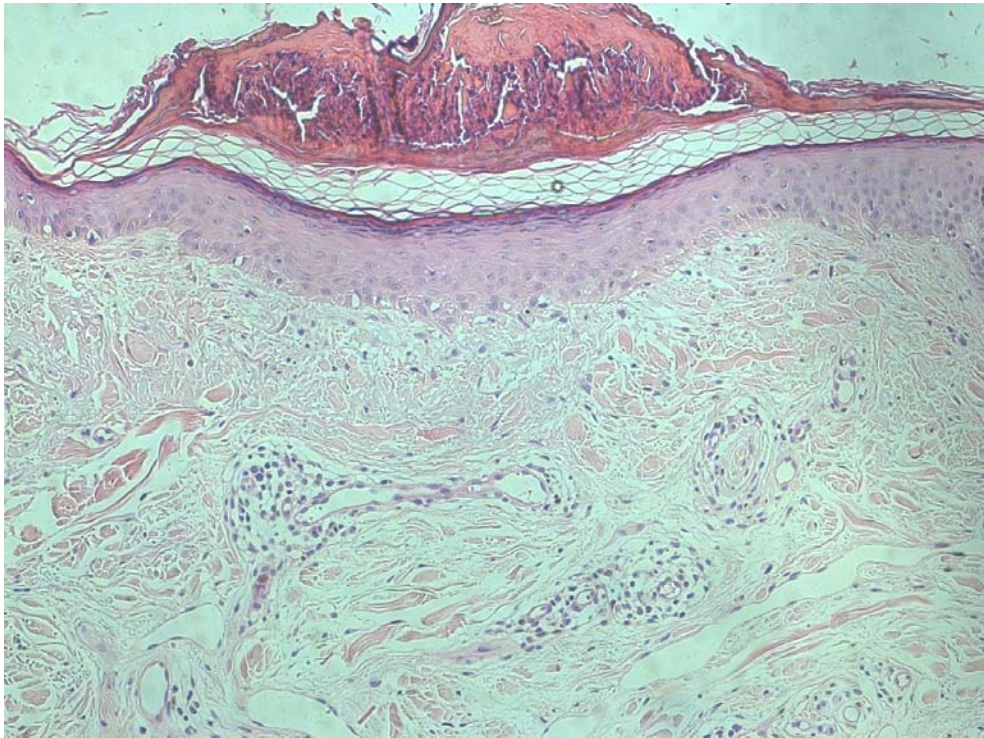
Na derme superficial havia um material eosinofílico correspondente à área de dano térmico residual (em forma de cone) com infiltrado inflamatório difuso (figura 20).



PO 3 dias

Figura 20 - Corte histológico da pele após 3 dias do tratamento com laser (H/E aumento 200x)

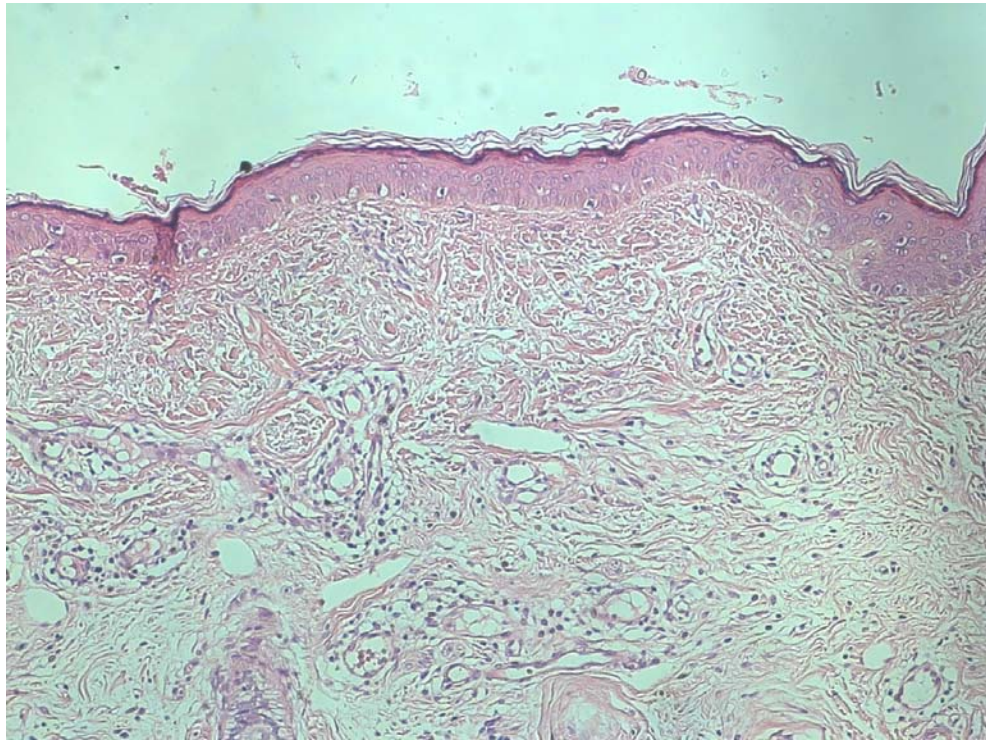
Em 7 dias, a epiderme estava íntegra, alguns campos ainda apresentavam crostícula acima da camada córnea, quase se destacando, e infiltrado inflamatório na derme (figura 21).



PO 7 dias

Figura 21 - Corte histológico da pele após 7 dias do tratamento com laser (H/E aumento 200x)

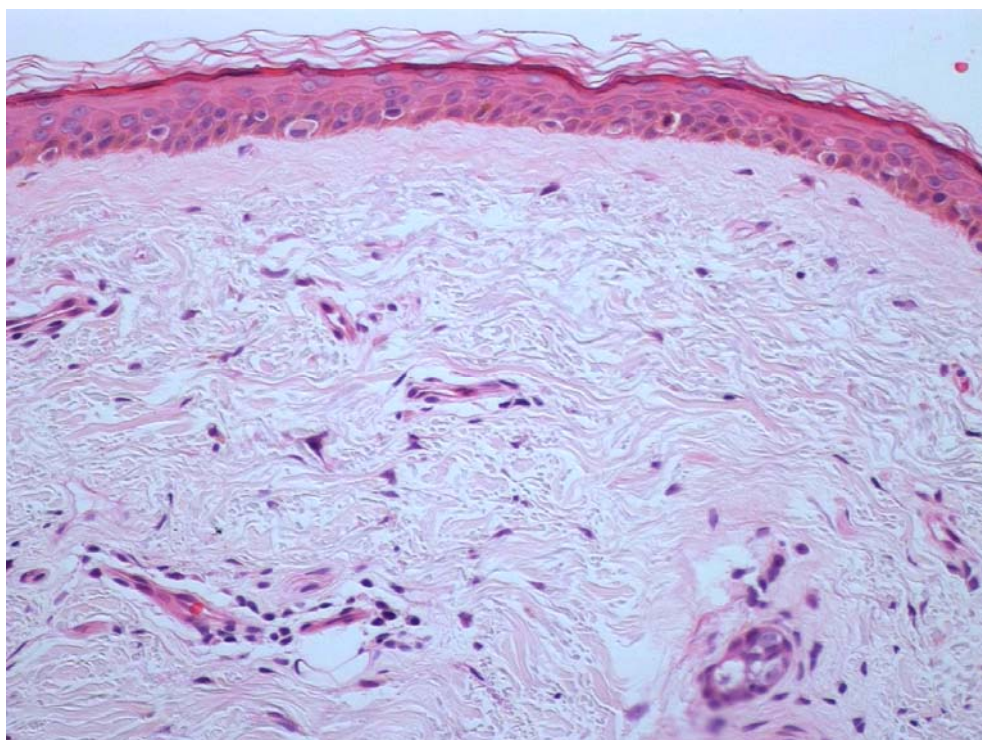
Em 14 dias não havia mais crostículas, a epiderme estava normal e a derme ainda mantinha um infiltrado inflamatório principalmente perivascular (figura 22).



PO 14 dias

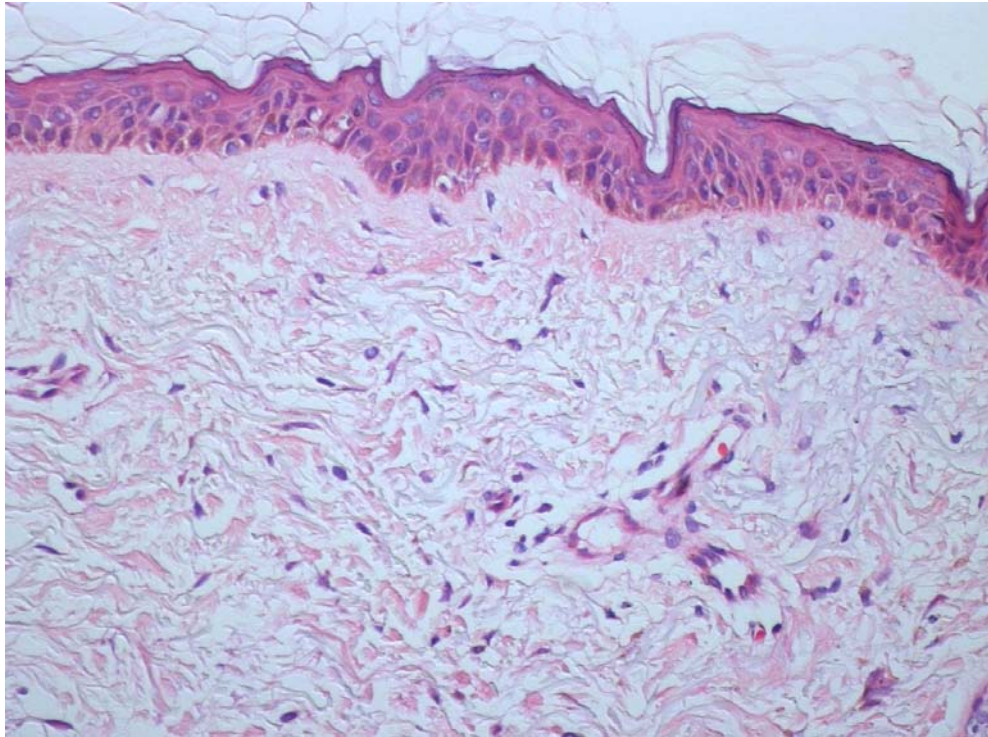
Figura 22 - Corte histológico de pele após 14 dias do tratamento com laser (H/E aumento 200x)

Na avaliação de 28 dias pós-tratamento observou-se um rejuvenescimento dos aspectos histológicos quando comparada com a da biópsia controle pré-laser (figura 23). A epiderme se mostrou multicelular e ondulada, junção dermoepidérmica mais nítida com finas fibras colágenas orientadas paralelamente à membrana basal da derme papilar. A derme mais profunda apresentava maior densidade de fibras do tecido conectivo, com espaços interfibrilares menores (figura 24).



PRÉ

Figura 23 - Corte histológico de pele controle pré-tratamento (H/E aumento 200x)



PO 28 dias

Figura 24 - Corte histológico de pele após 28 dias do tratamento com laser (H/E aumento 200x)

5.2 Resultado estatístico

Foram comparados os valores da média mais um desvio padrão de CD1a, TLRs 2, 3 e 9 antes e após 3, 7, 14 e 28 dias do laser pelo teste não-paramétrico de *Kruskal-Wallis*. O resultado é apresentado na tabela 5, considerando-se estatisticamente significativos valores de $p < 0,05$.

Tabela 5 - Valores de CD1a, TLRs 2, 3 e 9 pré e pós-tratamento

	Pré	Pós 3 dias	Pós 7 dias	Pós 14 dias	Pós 28 dias	Valor P*
	Média (DP)	Média (DP)	Média (DP)	Média (DP)	Média (DP)	
CD1a	11,09 (6,221)	5,736 (2,121)	4,909 (2,279)	2,630 (1,055)	9,977 (4,934)	0,0085
TLR 2	34,70 (13,59)	19,88 (12,05)	13,34 (6,755)	18,92 (14,74)	29,84 (13,26)	0,0108
TLR 3	11,61 (4,852)	10,94 (3,489)	25,54 (11,56)	30,25 (13,03)	24,42 (12,16)	0,0011
TLR 9	16,21 (9,975)	8,257 (4,632)	3,272 (5,984)	3,752 (4,783)	22,17 (10,66)	0,0012

*Teste não-paramétrico de *Kruskal-Wallis*

As evidências amostrais permitem dizer que existem diferenças significativas entre as medianas dos valores de CD1a ($p = 0,0085$), TLR 2 ($p = 0,0108$), TLR 3 ($p = 0,0011$) e TLR 9 ($p = 0,0012$) pré e após a irradiação da pele com o laser de Erbium-YAG fracionado.

Aplicando-se o pós-teste de Dunn, foi constatado que a significância se deu entre os valores:

- ❖ Pré e após 14 dias para CD1a (diminuição)
- ❖ Pré e após 7 dias para TLR 2 (diminuição)
- ❖ Pré e após 14 dias para TLR 3 (aumento)
- ❖ Pré e após 7 dias para TLR 9 (diminuição)

Os gráficos 5, 6, 7 e 8 representam os valores médios (mais um desvio padrão) da % de CD1a, TLRs 2, 3 e 9, respectivamente, antes e após 3, 7, 14 e 28 dias do tratamento.

Gráfico 5 - Porcentagem de CD1a antes e após 3, 7, 14 e 28 dias do tratamento

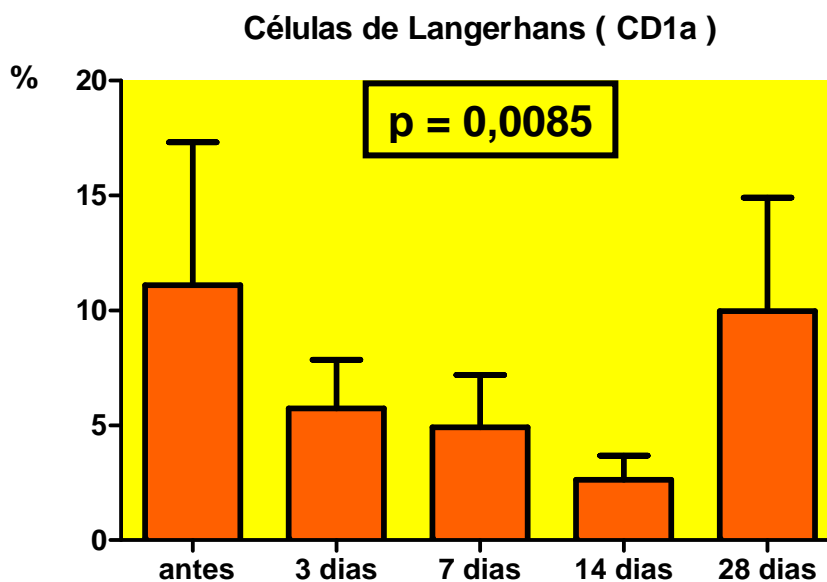


Gráfico 6 - Porcentagem de TLR 2 antes e após 3, 7, 14 e 28 dias do tratamento

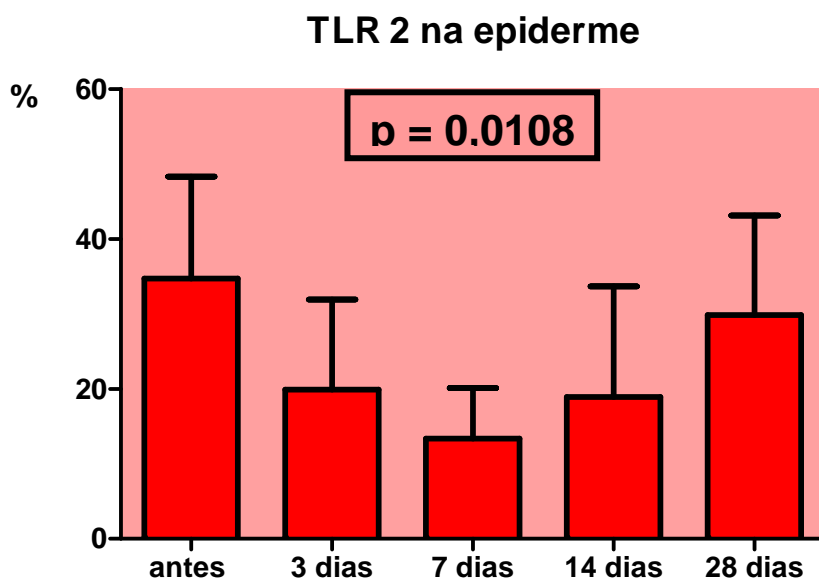


Gráfico 7 - Porcentagem de TLR 3 antes e após 3, 7, 14 e 28 dias do tratamento

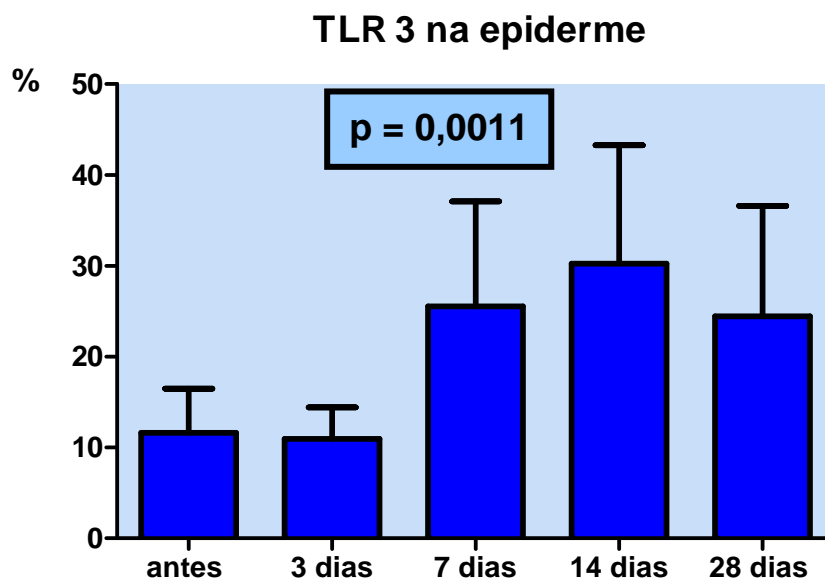
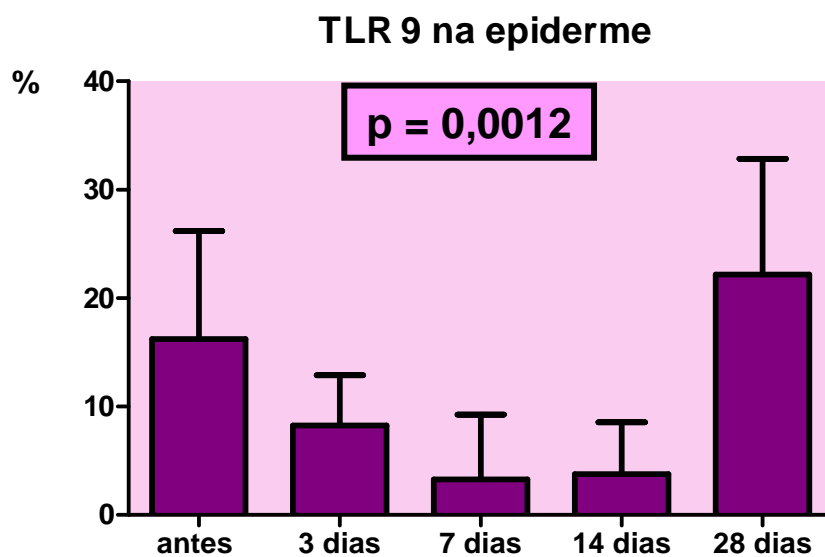


Gráfico 8 - Porcentagem de TLR 9 antes e após 3, 7, 14 e 28 dias do tratamento



A comparação dos valores da média mais um desvio padrão das fibras colágenas tipo III (verdes) e tipo I (vermelhas) pré e após 28 dias do tratamento foi realizada pelo teste não-paramétrico de Wilcoxon. O resultado é apresentado na tabela 6 e foram considerados níveis de significância de 5% ($p < 0,05$).

Tabela 6 - Valores da média e desvio padrão de fibras colágenas pré e pós tratamento.

Tempo	Pré-tratamento	Pós-tratamento	Valor p[‡]
	Média (DP)	Média (DP)	
Fibras tipo III	5,53 (0,86)	4,19 (2,78)	0,3125
Fibras tipo I	12,53 (8,85)	12,13 (9,98)	1,0000

[‡] Teste de Wilcoxon para comparação de grupos dependentes.

Não se encontraram diferenças estatisticamente significativas entre os valores medianos das fibras colágenas tipo III antes e depois do tratamento realizado ($p = 0,3125$). Observou-se, pelas evidências amostrais, que não existem diferenças significativas entre os valores medianos das fibras colágenas tipo I antes e depois do tratamento com laser ($p = 1,0000$).

Os gráficos 9 e 10 representam os valores médios (mais um desvio padrão) da % de fibras colágenas tipo III e I, respectivamente, antes e após 28 dias do tratamento.

Gráfico 9 - Porcentagem de fibras colágenas tipo III pré e pós-tratamento

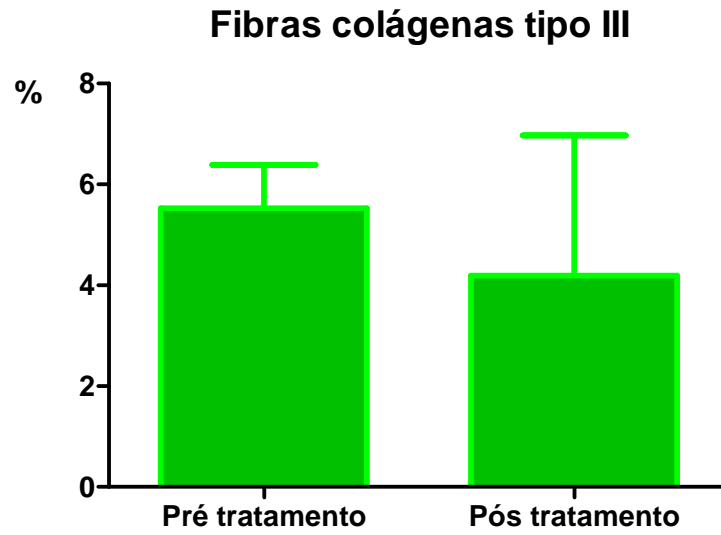
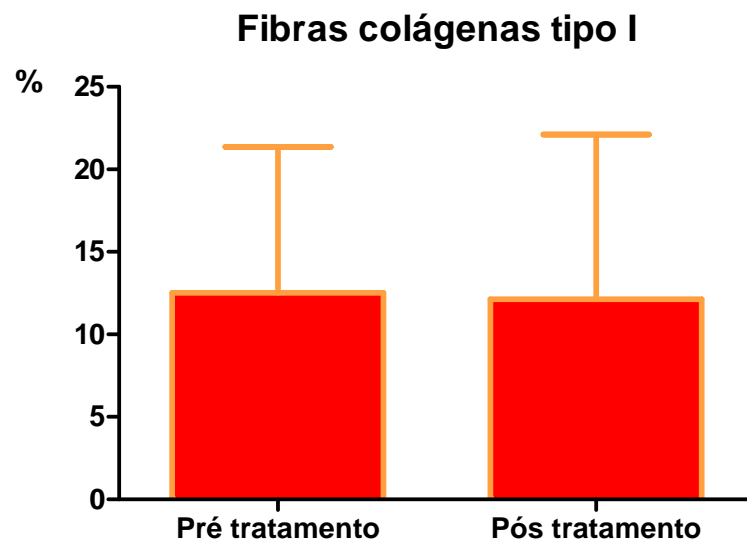


Gráfico 10 - Porcentagem de fibras colágenas tipo I pré e pós-tratamento



5.3 Evolução clínica pós-laser

No pós-laser imediato, a paciente sentiu um ardor intenso que atingiu um pico máximo poucos minutos após a aplicação da luz, evidenciando um eritema na região tratada. Esse ardor foi diminuindo com o tempo. Em 3 dias, havia um eritema e leve edema perioral com algumas crostículas escuras ainda aderidas. Nestes dias, a paciente referiu aumento da sensibilidade cutânea, principalmente ao lavar a pele. No sétimo dia já não havia sinais inflamatórios ou crostículas, mas a pele estava ressecada e com uma descamação fina. Em duas semanas a pele perioral estava totalmente recuperada (figura 25).



Figura 25 - Evolução clínica da pele perioral após o laser

5.4 Resultados clínicos

As fotos da região perioral antes e após 28 dias do laser foram pareadas para comparação clínica de todas as pacientes (figuras 26 a 45).



Figura 26 - Região perioral da paciente 01 pré e após 28 dias do tratamento

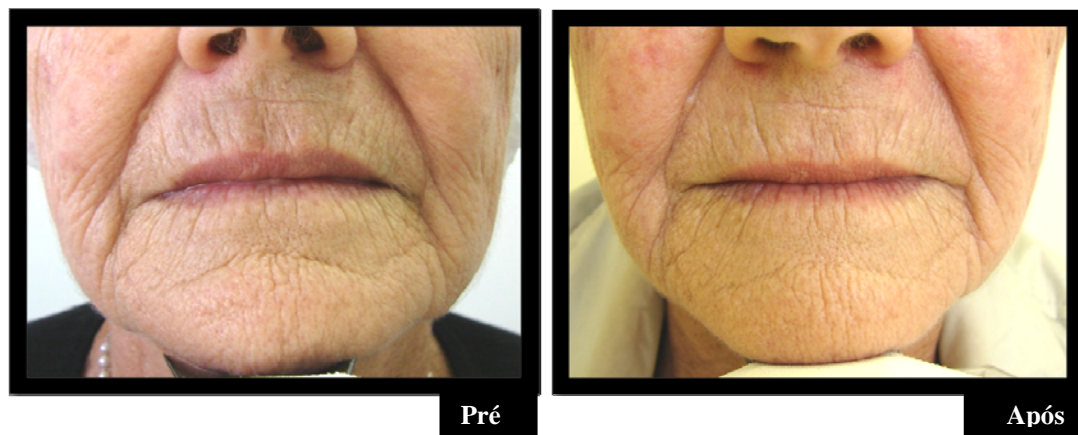


Figura 27 - Região perioral da paciente 02 pré e após 28 dias do tratamento



Figura 28 - Região perioral da paciente 03 pré e após 28 dias do tratamento

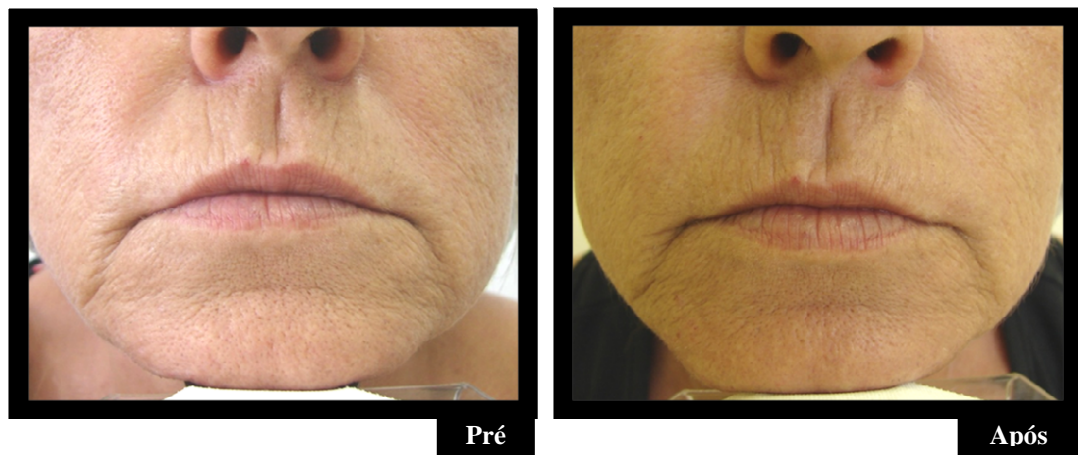


Figura 29 - Região perioral da paciente 04 pré e após 28 dias do tratamento

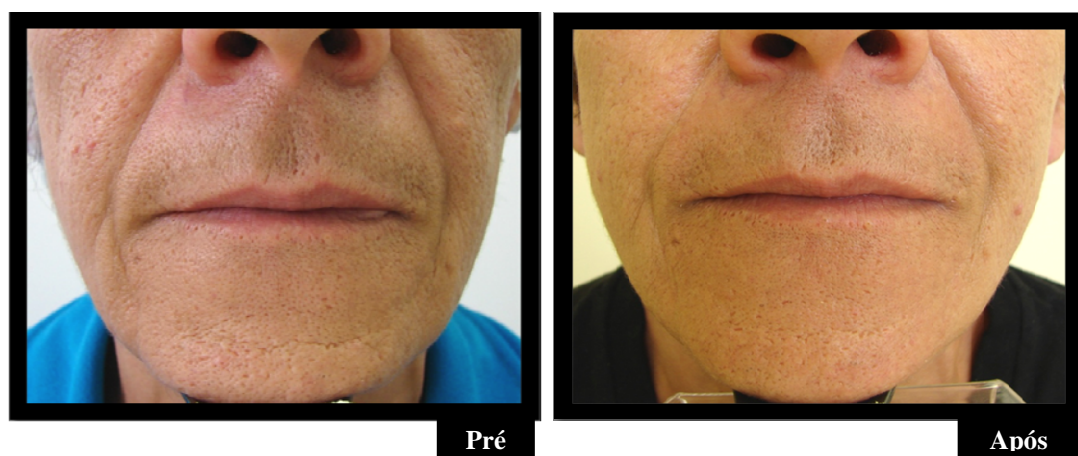


Figura 30 - Região perioral da paciente 05 pré e após 28 dias do tratamento



Figura 31 - Regi3o perioral da paciente 06 pr3 e ap3s 28 dias do tratamento



Figura 32 - Regi3o perioral da paciente 07 pr3 e ap3s 28 dias do tratamento

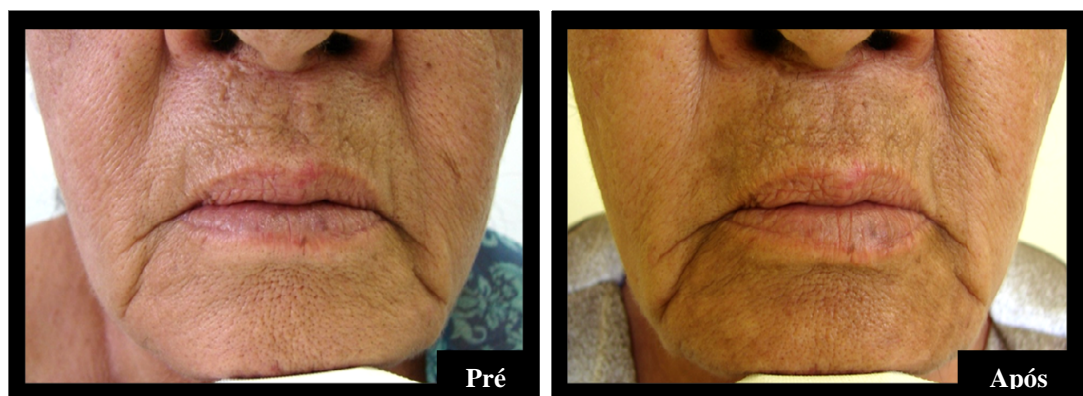


Figura 33 - Regi3o perioral da paciente 08 pr3 e ap3s 28 dias do tratamento



Figura 34 - Região perioral da paciente 09 pré e após 28 dias do tratamento



Figura 35 - Região perioral da paciente 10 pré e após 28 dias do tratamento

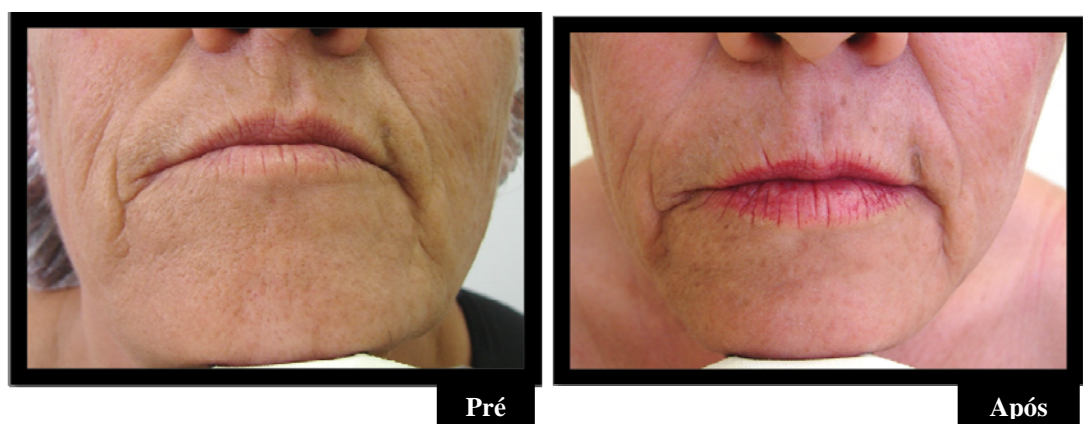


Figura 36 - Região perioral da paciente 11 pré e após 28 dias do tratamento

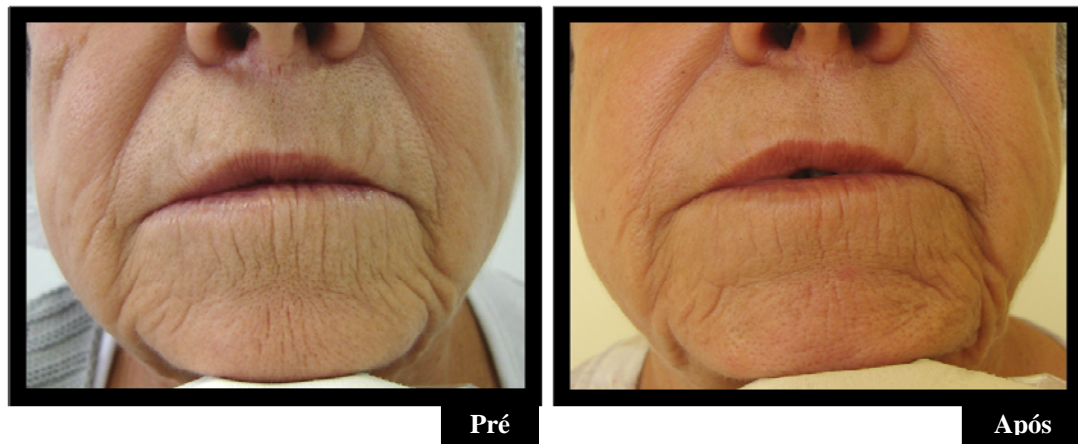


Figura 37 - Região perioral da paciente 12 pré e após 28 dias do tratamento



Figura 38 - Região perioral da paciente 13 pré e após 28 dias do tratamento

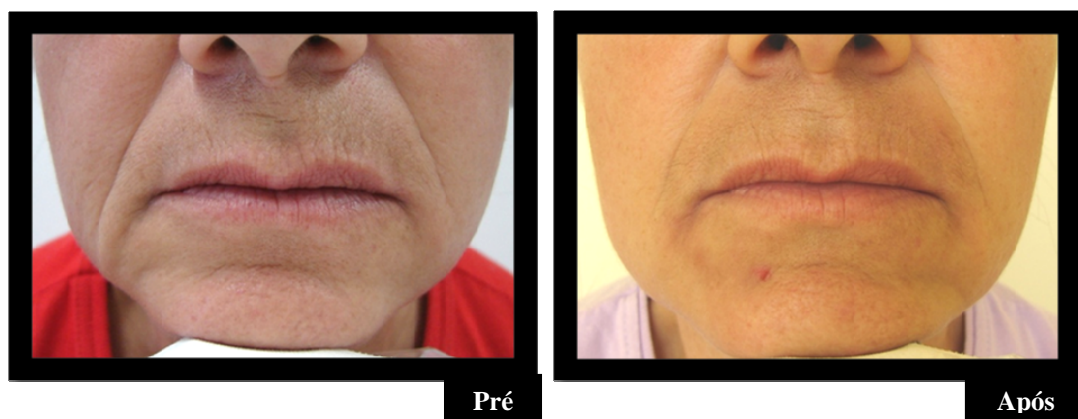


Figura 39 - Região perioral da paciente 14 pré e após 28 dias do tratamento

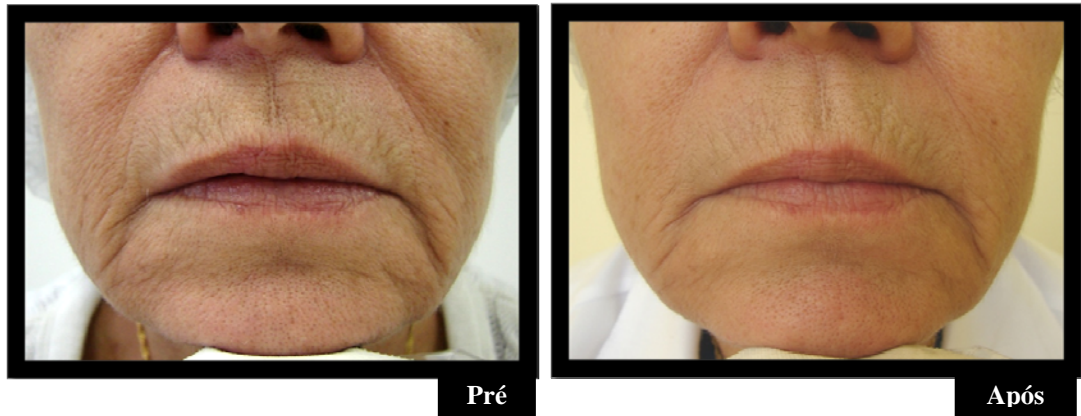


Figura 40 - Região perioral da paciente 15 pré e após 28 dias do tratamento

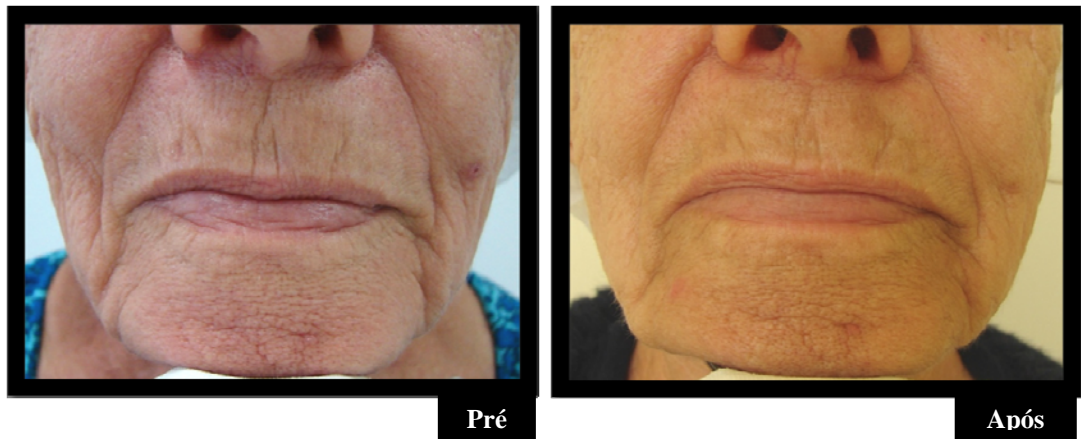


Figura 41 - Região perioral da paciente 16 pré e após 28 dias do tratamento



Figura 42 - Região perioral da paciente 17 pré e após 28 dias do tratamento



Figura 43 - Região perioral da paciente 18 pré e após 28 dias do tratamento



Figura 44 - Região perioral da paciente 19 pré e após 28 dias do tratamento



Figura 45 - Região perioral da paciente 20 pré e após 28 dias do tratamento

Em relação às rugas periorais, o observador cego concluiu que 40% das pacientes apresentavam classificação de Baker tipo I, 15% tipo II e 45% tipo III pré-tratamento. Após 1 mês da aplicação do laser, 55% foram classificadas como tipo I, 15% tipo II e 30% tipo III. Apenas 30% das pacientes obtiveram melhora nos seus índices em apenas 1 grau. 70% mantiveram a mesma classificação do pré-laser (tabela 7). Nenhuma delas apresentou melhora em 2 graus ou piora.

Tabela 7 - Classificação de Baker para rugas pré e após 28 dias do tratamento

Paciente	Pré	Pós 28 dias
1	II	I
2	III	III
3	III	III
4	I	I
5	I	I
6	III	III
7	I	I
8	II	I
9	I	I
10	III	II
11	III	III
12	III	II
13	I	I
14	I	I
15	II	I
16	III	II
17	I	I
18	III	III
19	III	III
20	I	I

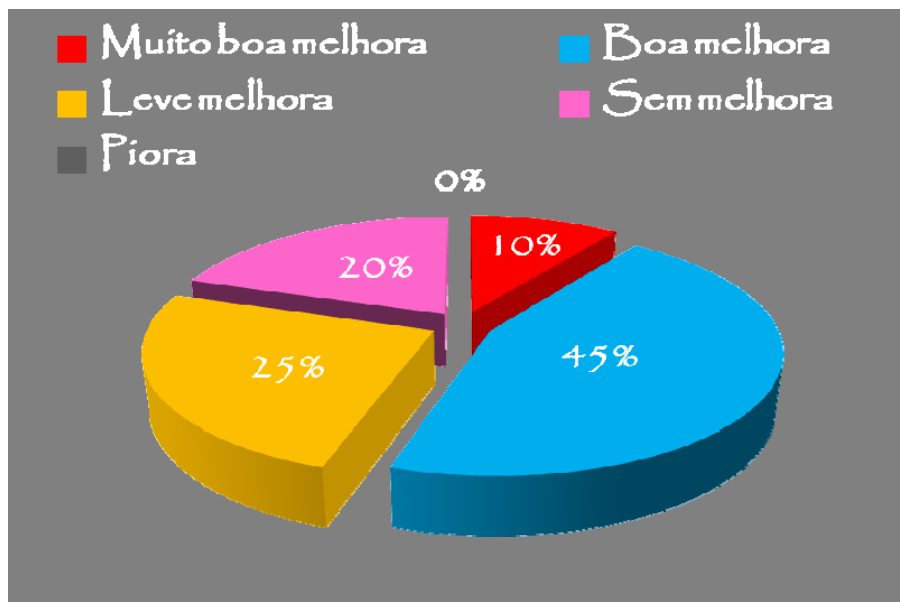
Uma análise mais subjetiva das rugas também foi efetuada considerando a intensidade de melhora, sendo que 20% das pacientes obtiveram melhora importante, 25% melhora moderada, 20% melhora leve e 35% nenhuma melhora das rírides periorais após 28 dias do procedimento (tabela 8). Nenhuma paciente apresentou piora do quadro.

Tabela 8 - Classificação da intensidade de melhora das rugas periorais após 28 dias do laser

Importante	20%
Moderada	25%
Leve	20%
Nenhuma	35%

O índice de melhora estética global da região tratada teve o seguinte resultado: 20% não apresentaram melhora, ou seja, a aparência pós-laser é igual à original; 25% leve melhora, o que significa melhora da aparência, mas um re-tratamento é indicado; 45% boa melhora, melhora marcante da aparência, mas uma complementação seria bom para um toque final; e 10% muito boa melhora, com resultado cosmético ótimo do laser. Nenhuma paciente apresentou piora do GAIS (gráfico 11).

Gráfico 11 - Escala de melhora estética global da região perioral após 28 dias do tratamento



As pacientes foram questionadas em relação ao seu grau de satisfação com o resultado do tratamento após 1 mês de evolução. 15% declararam estar pouco satisfeitas, 70% satisfeitas e 15% muito satisfeitas. Nenhuma insatisfeita totalmente (gráfico 12).

95% das pacientes referiram que recomendariam o laser para outra pessoa e que repetiriam o tratamento se fosse necessário. 85% delas também disseram que o tratamento aumentou sua autoestima, sentindo-se mais atraentes.

Gráfico 12 - Grau de satisfação com o resultado do tratamento.



Muitos dos efeitos colaterais observados após o procedimento eram esperados como os sinais inflamatórios por injúria térmica. Todas as pacientes apresentaram ardor e eritema no pós-laser imediato, 15% desenvolveram edema da região.

Em 3 dias, os sinais e sintomas mais importantes foram eritema (95%), edema (70%), ressecamento (100%), descamação (95%) e prurido (70%). 30% das pacientes ainda apresentavam ardor/dor perioral e em 5% surgiram pústulas.

No sétimo dia a maioria ainda apresentava eritema (70%), ressecamento (60%) e descamação (70%) da pele. Foi neste controle que se detectaram as erupções herpéticas (25% - figura 46), sendo o período de maior risco entre o quarto e sexto dia pós-laser. 5% das pacientes sentiam ardor/dor e 35% prurido na região tratada. 5% das pacientes desenvolveram leve hipocromia, 5% queilite angular e 20% erupção acneiforme leve (figura 47a).

Na segunda semana, 50% das pacientes ainda apresentavam leve eritema, 10% referiam prurido e ressecamento, 5% mantinham algumas pústulas e

descamação residual. Algumas pacientes desenvolveram hiperchromia pós-inflamatória (5%), e 15% das pacientes estavam com queilite angular em processo de cicatrização (figura 47b).

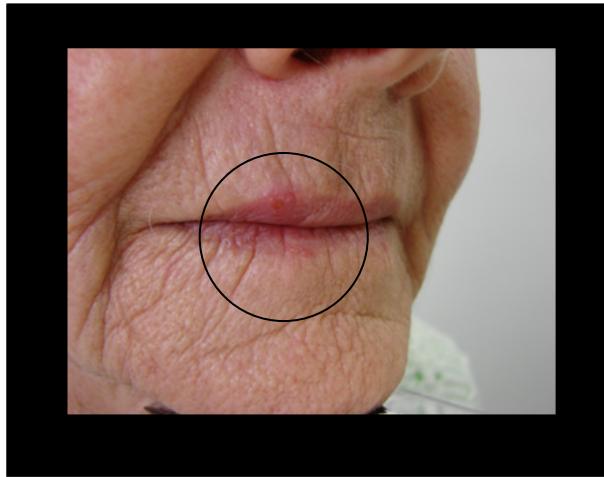


Figura 46 - Erupção herpética

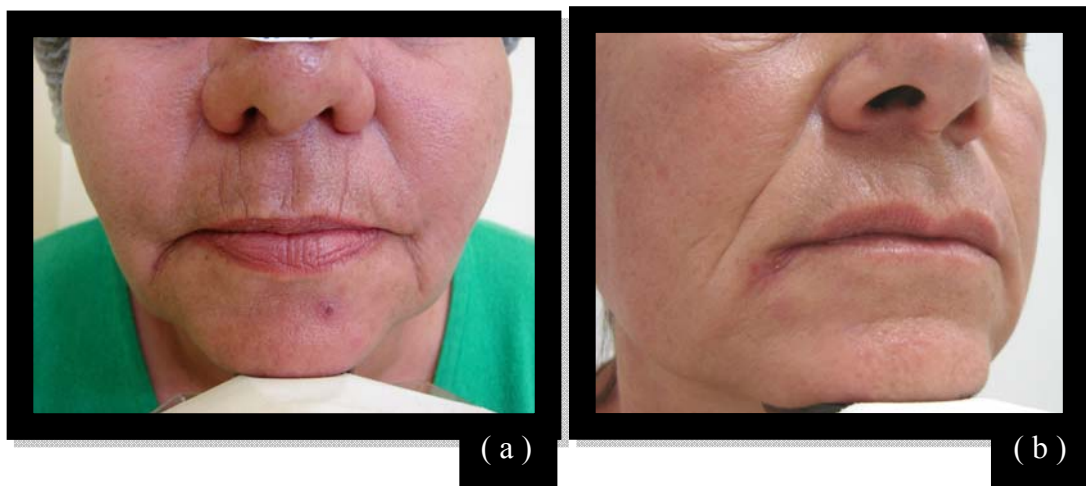


Figura 47 - Erupção acneiforme - pústula (a). Queilite angular (b)

No último retorno de controle, as pacientes apresentavam apenas hiperpigmentação residual (20%), 3 pacientes de intensidade leve e 1 moderada.

A tabela 9 resume a incidência dos efeitos colaterais encontrada nos retornos de controle após o tratamento. Felizmente todos esses efeitos foram transitórios, de curta duração e apresentaram resolução espontânea apenas realizando higiene local, hidratação com vaselina líquida e proteção solar.

Tabela 9 - Incidência dos efeitos colaterais segundo tempo de evolução pós-laser

Efeito colateral	imediato	3 dias	7 dias	14 dias	28 dias
Ardor/dor	100%	30%	5%	0	0
Eritema	100%	95%	70%	50%	0
Edema	15%	70%	0	0	0
Ressecamento	0	100%	60%	10%	0
Descamação	0	95%	70%	5%	0
Prurido	0	70%	35%	10%	0
Hipocromia	0	0	5%	0	0
Hiperpigmentação	0	0	0	5%	20%
Cicatriz	0	0	0	0	0
Erupção acneiforme	0	5%	20%	5%	10%
Herpes	0	0	25%	0	0
Queilite angular	0	0	5%	15%	0

6 Discussão

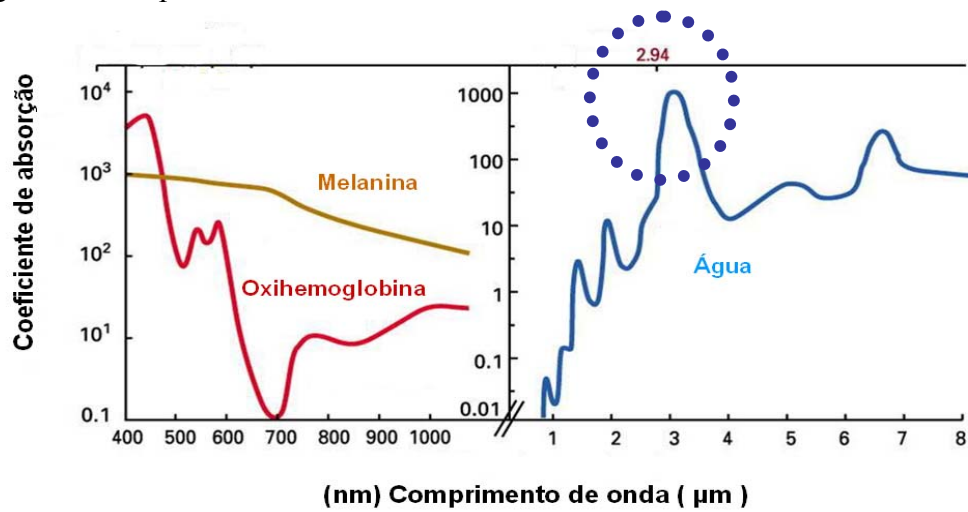
As alterações do fotoenvelhecimento podem ser tratadas por meio de diversas modalidades terapêuticas. Os mais recentes tratamentos envolvem a fototerapia devido ao grande desenvolvimento da tecnologia em lasers nas últimas décadas.

Os lasers têm como princípio de ação a fototermólise seletiva, cada comprimento de onda tem um certo coeficiente de absorção pelos alvos: melanina, hemoglobina e água (gráfico 13)(82). Quanto maior o coeficiente de absorção, maior é a seletividade da irradiação no alvo, minimizando danos a estruturas adjacentes (83).

Os lasers ablativos são muito eficientes para rejuvenescer a pele em apenas 1 sessão. Devido à completa vaporização da epiderme e/ou parte da derme associada à coagulação do tecido vizinho, o estímulo para a reparação da pele é intenso, com grande formação de colágeno. Porém, o tempo de recuperação é prolongado, além de apresentar altos riscos de complicações.(2)

Já os lasers não ablativos apresentam riscos mínimos, mas só promovem resultados satisfatórios após múltiplas sessões de tratamento para o clareamento de manchas e telangiectasias. Melhora a textura da pele, tendo ação limitada nas rugas mais profundas.(4)

Gráfico 13 - Curva do coeficiente de absorção da melanina, oxihemoglobina e água segundo o comprimento de onda



Coeficiente de absorção dos alvos:

Melanina 250 a 1200nm
 Oxihemoglobina picos em 418nm, 542nm, 577nm
 Água pico em 294nm (Erbium-YAG)

Uma nova tecnologia em laser foi desenvolvida, buscando o equilíbrio entre eficácia e segurança no tratamento do fotoenvelhecimento. Esses lasers também agem por meio da fototermólise seletiva, cujo alvo é a água, mas empregam um padrão diferenciado de dano térmico. O fracionamento do raio laser forma colunas de lesões térmicas microscópicas na epiderme e derme, rodeadas por tecido sã que fornece células viáveis para a regeneração da pele. A restauração da superfície de um tecido lesado é obtida pela movimentação dos queratinócitos a partir das bordas livres, inclusive aqueles que contornam os folículos pilosos e as glândulas sudoríparas, para dentro da ferida (84). A rápida cicatrização do laser fracionado minimiza os riscos de complicações como as infecções, mas mantém o estímulo para neocolagênese por causar ablação e coagulação da pele (83).

O resultado da fototermólise fracionada microablativa para o rejuvenescimento é bastante superior quando comparado com as técnicas não ablativas, mas ainda assim múltiplas sessões são necessárias para tratar as rugas mais profundas.

Recentemente, o laser de CO₂ também foi fracionado. Ele tem um maior comprimento de onda que o Erbium-YAG de 2940nm, conferindo maior poder de penetração na pele com melhores resultados para o tratamento de rugas em poucas sessões. Porém, complicações de cicatrizes já foram descritas pós-laser fracionado de CO₂ no pescoço e infraocular, talvez por serem áreas de pele mais fina (85,86).

O Erbium-YAG de 2940nm tem maior afinidade pela água e, por isso, faz finas ablações teciduais, resultando em menor morbidade quando comparado ao laser de CO₂ (87). A lesão térmica não deve atingir a derme reticular profunda, para evitar a formação de cicatrizes e áreas hipocrômicas, que podem surgir após 2 anos do procedimento (88).

Mesmo na fototermólise fracionada, chegar aos parâmetros que conferem equilíbrio entre eficácia e segurança ainda é motivo de estudos. A extensão da lesão térmica depende de múltiplos fatores variáveis como: comprimento de onda do laser, espessura da pele, energia, duração do pulso, densidade de pixels, frequência dos pulsos, pulsos estacionários etc.

Diferentes técnicas usando o Erbium-YAG fracionado microablativo foram avaliadas na tentativa de otimizar os resultados para as ríides em apenas uma sessão. Alguns trabalhos científicos mostraram que quanto maior o número de passadas ou de pulsos estacionários maior a lesão térmica tecidual, tanto em profundidade quanto em superfície, e melhores os resultados clínicos de rejuvenescimento sem complicações relatadas (75, 89).

Neste estudo optou-se por um protocolo com maior número de pulsos estacionários do que passadas, porque quanto maior o número de passadas, maior é a superfície de área tratada, perdendo as características e vantagens do fracionamento. Associado aos 6 pulsos estacionários, utilizamos a máxima energia de 1400mj/cm², com a ponteira 7x7, que tem menor densidade de pixels e é, portanto, mais potente, pois maior a energia térmica distribuída em cada pixel.

Apesar do aparente rejuvenescimento histológico na coloração H/E, com maior densidade e organização das fibras colágenas e elásticas após 28 dias do tratamento, apenas 20% das pacientes apresentaram melhora importante das rugas e somente 30% conseguiram melhorar em 1 grau sua classificação de Baker para as rugas periorais.

Este resultado clínico insatisfatório para as ríides pode ser explicado pela coloração com Picrosírius, que evidencia as bandas de colágeno; na sua avaliação não se encontraram diferenças estatisticamente significativas entre os valores medianos dos colágenos tipo I e III antes e após 28 dias da irradiação com laser.

As fases da cicatrização normal de feridas por segunda intenção são: hemostasia, inflamação, proliferação e remodelação. Nesta última fase, a matriz extracelular e os fibroblastos controlam-se mutuamente até que uma matriz estável se forme em meses a anos (84). A maioria das bandas de colágeno na derme são mistas, formadas por colágeno do tipo I, mas também constituídas por colágenos do tipo III e V em menor porcentagem. Durante 3 meses, desde a fase da proliferação, a síntese do colágeno tipo III, estimulada pelo TGF- β , inicia-se antes do colágeno tipo I, mas com o tempo esta razão se inverte, pois a produção do tipo III diminui (90). Laubach e col. encontraram evidências de aumento da produção de colágeno tipo III, através da imuno-histoquímica, 7 dias após a fototermólise fracionada (5).

Portanto, a leitura da formação de colágeno com 28 dias de evolução pode ter sido tardia para o colágeno tipo III e precoce para o colágeno tipo I e por isso não foram constatadas diferenças significativas entre as fibras de colágeno antes e após a fototerapia. Talvez um tempo de observação mais prolongado poderia mudar esse resultado estatístico para o colágeno tipo I.

A melhora das ríides periorais em alguns casos pode ter sido decorrente do aumento de outros elementos fibrilares como as fibras elásticas e/ou elementos da matriz extracelular como ácido hialurônico e glicosaminoglicanos que formam o tecido de sustentação da pele, mas não foram objetos de pesquisa nesse estudo.

As pacientes que se submeteram ao estudo, além das ríides periorais, apresentavam alterações da coloração e textura da pele que foram melhoradas com o laser. Isto explica porque 55% das pacientes apresentaram de boa a muito boa melhora do aspecto estético global (GAIS) da região tratada, mesmo sem ter mudado a classificação de Baker para rugas.

E por isso 85% delas relataram estar de satisfeitas a muito satisfeitas com o tratamento, melhorando a sua autoestima.

A terapia com o laser fracionado microablativa foi bem tolerada mesmo sem nenhum método de analgesia. Metade das pacientes referiram dor leve, porém é descrito na literatura que o uso de lidocaína tópica ocluída antes e/ou a aplicação de ar resfriado concomitante à luz poderia diminuir ainda mais o desconforto do procedimento (91).

O protocolo deste estudo se mostrou bastante seguro por ter apresentado efeitos colaterais transitórios, de rápida resolução, semelhante aos dados da literatura.

O período mais crítico de desconforto foi nos primeiros 3 dias, quando as pacientes ainda apresentavam sinais inflamatórios importantes e crostículas aderidas, referindo aumento da sensibilidade local.

Uma das complicações mais comuns pós-laser ablativo é o eritema persistente que não ocorreu neste estudo, pois 100% das pacientes não apresentavam eritema no controle de 28 dias.

Outra complicação é a hiperpigmentação pós-inflamatória, cuja incidência foi de 20% neste trabalho, sendo que a maioria apresentou uma hiperpigmentação leve. Talvez a hiperpigmentação poderia ter sido evitada com o preparo da pele com agentes clareadores e tretinoína antes e após o tratamento tão logo houvesse a regeneração cutânea.

A tretinoína tópica, além de diminuir a hiperpigmentação pós-inflamatória, especialmente nas pessoas de pele escura, também auxilia no processo de cicatrização e aumenta o número das células de Langerhans (92, 93, 94).

Fora do protocolo, todas as pacientes que apresentaram hiperpigmentação no primeiro mês de evolução foram acompanhadas por mais tempo e tiveram o clareamento total das manchas no decorrer dos meses (entre 1 e 2 meses), apenas com os cuidados de proteção solar (figura 48). Com a melhora da hiperpigmentação, observou-se também melhora da textura da pele e das rugas periorais, ratificando a discussão anterior de que um período mais prolongado de observação (maior que 28 dias) poderia revelar uma melhora mais significativa das rugas.



Figura 48 - Complicações pós-laser fracionado microablativo: herpes simples e hiperchromia pós-inflamatória. Resolução sem sequelas e fotorejuvenescimento perioral no PO tardio de 4 meses

A complicação mais importante relatada foi a erupção herpética pós-laser em 25% das pacientes, manifestando-se com dor, calor, formação de vesículas e ulcerações periorais entre o quarto e sexto dia do tratamento. As lesões sanaram espontaneamente (média de 7 dias), apenas mantendo a higiene local. Nenhum dos casos evoluiu com cicatrizes inestéticas ou outras complicações pelo herpes.

Os vírus do herpes simples tipo 1 e 2 são vírus DNA que causam infecção do epitélio estratificado escamoso da mucosa oral, genital, conjuntiva, córnea e pele. Durante a infecção primária, o vírus infecta a terminação do nervo sensorial adjacente ao local acometido, e alcança o gânglio sensorial, onde persiste em estado latente.

Esporadicamente há reativação do HSV-1, que migra do gânglio sensorial de volta ao tecido epitelial, causando uma série de manifestações clínicas inflamatórias (33).

A resposta imune inata do hospedeiro contra o HSV depende das células NK e das células secretoras de IFN.

Nos hospedeiros imunocompetentes, a infecção pelo HSV-1 estimula a secreção de IFN α , que tem a função de inibir a transcrição dos genes virais e ativar as células NK (95). A interação com a célula parasitada somada ao sinal proveniente das citocinas inflamatórias induz a célula NK a liberar seu conteúdo citolítico de perforinas e granzimas, que levarão à morte da célula infectada (96).

O IFN α também limita a progressão da infecção dos tecidos periféricos para o sistema nervoso (95).

As células de Langerhans, quando ativadas pelo antígeno viral, expressam antígenos de histocompatibilidade HLA classe II, migram da epiderme para o linfonodo local e apresentam estes antígenos aos linfócitos T ou às outras células dendríticas residentes no linfonodo para ativar a resposta imune específica (97).

O rápido reconhecimento do vírus é essencial para a ativação destes sistemas de defesa, e os receptores intracelulares de ácidos nucleicos virais, TLRs 3, 7, 8 e 9, são frequentemente destacados para essa função, com capacidade de induzir à produção de IFNs tipo I, que são uma série de citocinas com efeitos inibitórios diretos na replicação viral (98).

Os vírus que contêm DNA obrigatoriamente têm uma fase de desenvolvimento intracelular em que a formação de ssRNA, reconhecido pelos TLRs 7 e 8, é necessária para a produção de suas proteínas (99). Porém, como os TLRs 7 e 8 não estão presentes nos queratinócitos e apresentam fraca expressão nas células de

Langerhans e expressão desconhecida nos melanócitos, tais receptores não foram analisados no presente estudo, que basicamente avaliou as alterações de componentes da imunidade inata epidérmicos, por serem a primeira linha de defesa contra o HSV.

É descrito na literatura que os TLRs 2, 3 e 9 estão presentes nos queratinócitos e células de Langerhans, e são apontados como receptores do sistema imune inato, que respondem contra o HSV. Enquanto o TLR 2 reconhece moléculas estruturais nos vírions, o TLR 9 reconhece o genoma viral (CpG oligonucleotídeos não metilados). Existem relatos de acúmulo de RNA de cadeia dupla (dsRNA) em células infectadas pelo HSV, que é reconhecido pelo TLR 3 (100).

Em seus experimentos animais, Kurt-Jones e col. demonstraram que o TLR 2, quando ativado pelo HSV-1, induz à secreção de citocinas pelos macrófagos. Porém, esta interação HSV/TLR 2 não é protetora, muito pelo contrário, contribui para encefalite letal em camundongos (101).

Já o TLR 3 é vital para a imunidade natural contra o HSV-1 no sistema nervoso central (102). O comprometimento da sinalização pelo TLR 3 em fibroblastos de pacientes com encefalite pelo HSV-1 leva à produção deficiente de IFN α , β e λ , aumento da replicação viral, culminando com morte celular. A ativação de TLR 3 resulta na produção de TNF α , IL-8, IFNs tipo I, CCL2, CCL20 nos queratinócitos humanos. Nas células dendríticas Langerhans-like, a estimulação do TLR 3 aumenta a produção de IFNs tipo I, sugerindo que as células de Langerhans podem iniciar atividades antivirais diretas após ativação desse receptor (39).

Lund e col. notaram que a produção de IFN α nas células dendríticas plasmocitóides de camundongos induzida pelo HSV-2 ocorre através da sinalização de TLR 9 (103).

O tratamento com o laser de Erbium-YAG fracionado, por ser microablativo, teoricamente poderia causar diminuição tanto das células de Langerhans como dos receptores TLRs 2, 3 e 9, comprometendo a imunidade cutânea inata e consequentemente a resposta adaptada contra o HSV.

Ghazawie et al., em 1999, demonstraram que, após 2 dias de uma lesão térmica sobre a pele, houve o completo desaparecimento das células de Langerhans na epiderme de roedores. Três dias após o trauma, estas células começaram a reaparecer esparsamente, provavelmente por precursores na derme, algumas sem dendritos e outras com raros dendritos curtos. O número das células de Langerhans cresceu drasticamente entre o quinto e sétimo dia, atingindo sua normalidade no décimo primeiro dia após a injúria (104).

Neste estudo, a avaliação imuno-histoquímica das células de Langerhans revelou diferenças estatisticamente significativas ($p = 0,0085$) entre as medianas dos valores de CD1a antes e após o tratamento, com diminuição progressiva até o décimo quarto dia e posterior recuperação dos níveis basais em 28 dias. O pós-teste de Dunn revelou que a significância se deu entre os valores pré e pós 14 dias da irradiação com o laser.

O mesmo ocorreu com os TLRs 2 e 9. Esse estudo demonstrou diferenças estatisticamente significativas entre as medianas dos valores de TLR 2 ($p = 0,0108$) e 9 ($p = 0,0012$), antes e após o tratamento, sendo que a significância se deu entre os valores pré e pós 7 dias do procedimento. Foi constatada uma diminuição gradativa dos valores de TLRs 2 e 9 na epiderme, atingindo um mínimo no sétimo dia pós-laser. Em 14 dias, os valores de TLRs 2 e 9 mostram uma ascensão, atingindo os níveis pré-tratamento com 28 dias de evolução, acompanhando a re-população

gradativa dos queratinócitos e células de Langerhans. Esses dados não foram encontrados na literatura consultada, sendo inéditos.

Após o laser microablativo, o retorno à normalidade dos TLRs 2 e 9 é estimulado durante a cicatrização da pele pelos fatores de crescimento, como TGF α e β , que são produzidos para induzir a proliferação das células epiteliais e restabelecer a barreira física. Estes fatores de crescimento atuam sinergicamente com os mecanismos de sinalização dos TLRs, a fim de regular a resposta de defesa do hospedeiro (38,105,106).

Assim, apesar da rápida re-epitelização da pele perioral após o laser fracionado microablativo, a pele ainda apresenta-se vulnerável às infecções virais por pelo menos 2 semanas, devido à diminuição das células de Langerhans e TLRs 2 e 9, que são componentes importantes para uma boa resposta imunológica contra o HSV.

Avaliando por outro ângulo, das 5 pacientes que apresentavam história pregressa de lesões herpéticas labiais, apenas 2 reativaram a infecção depois do procedimento. Muitos fatores podem estar envolvidos para a reativação herpética; o fato de ter antecedentes da doença não quer dizer que certamente haverá reativação com o tratamento a laser.

Krug e col. mostraram *in vitro* que a secreção de IFNs do tipo I e IL-12 em resposta ao HSV-1 é mediada pela via TLR 9/ My88 nas células dendríticas plasmocitóides sem a necessidade de replicação viral. Este mesmo grupo também concluiu que os animais, cujas células apresentavam deficiência de TLR 9 e/ou My88, foram capazes de controlar a replicação do HSV-1, demonstrando que vias independentes da TLR 9/My88 de outras células podem compensar de maneira efetiva a resposta inadequada das células produtoras de interferons defeituosas.

Células epiteliais, fibroblastos, macrófagos e outras células infiltradas na pele ou na mucosa infectada pelo HSV-1 podem reconhecer e responder contra o HSV-1 por meio de vias independentes da TLR 9/My88. Uma das hipóteses é que a replicação do vírus intracelular gera dsRNA; este é reconhecido pelo TLR 3, que sinaliza via TRIF induzindo à secreção de IFN- β o suficiente para conter a disseminação do HSV (95).

Nesse estudo observaram-se diferenças significativas entre os valores das medianas de TLR 3 ($p = 0,0011$) na epiderme antes e após o procedimento, com significância entre os valores pré e pós 14 dias do tratamento. Porém, ao invés de diminuir, como ocorreu com os TLRs 2 e 9, esses valores constatados no sétimo dia do tratamento aumentaram progressivamente, e atingiram um pico máximo na segunda semana, mantendo-se elevados em relação aos níveis basais no último controle (PO 28 dias). A expressão aumentada do TLR 3 talvez tenha protegido 75% das pacientes que não apresentaram erupções herpéticas pós-laser, mesmo aquelas com antecedentes pessoais positivos da doença.

O estímulo excessivo do TLR 3 está associado a diversas doenças inflamatórias, como a nefrite lúpica e a artrite reumatóide (107,108), sugerindo que ligantes endógenos como proteínas intracelulares ou produtos da clivagem dessas proteínas poderiam estimular este receptor presente no endossomo celular. O aumento da expressão de TLR 3 pode estar relacionado ao processo de cicatrização, estimulado por proteínas intracelulares alteradas pelo dano térmico. A presença de ligantes endógenos acontece geralmente após injúria tecidual, especialmente se muitas células sofrem necrose.

A perturbação do ambiente celular poderia induzir mudanças estruturais de algumas moléculas, que por sua vez adquiririam atividades agonistas de TLRs, ou alterar a posição dos ligantes intracelulares, muitas vezes confinados em um compartimento, ficando estes mais próximos dos TLRs. Dessa forma, o TLR 3 não apenas seria importante para mediar a resposta contra infecções virais, mas também contra o dano e morte celular.

Devido à sua ampla ação biológica, os TLRs participam nas diferentes fases de cicatrização. A ativação dos TLRs modifica a injúria tecidual de forma negativa ou positiva, por recrutar células inflamatórias que liberam mediadores citotóxicos ou ativando sinais cito-protetores. Promovem ainda a resposta fibrogênica nos fibroblastos, participando da regeneração tecidual. O TLR 4, por exemplo, está envolvido na angiogênese, que visa restaurar o suprimento sanguíneo da região lesada (51).

A paciente que apresentou o quadro mais exuberante e prolongado de herpes foi uma das que mais rejuvenesceram a região perioral, talvez pelo processo inflamatório mais acentuado culminando com maior formação de colágeno (figura 49).

Apesar do ótimo rejuvenescimento perioral, a erupção herpética deixou a paciente muito incomodada no período de recuperação pós-laser. Foi a única pessoa que declarou que não repetiria o tratamento se fosse necessário, nem recomendaria o laser para outra pessoa devido a esse risco de complicação.



Figura 49 - Evolução clínica da paciente pós-laser com erupção herpética

De qualquer forma, 25% é um índice elevado para uma infecção e, portanto, a profilaxia antiviral é recomendada para todos os pacientes que se submeterem ao tratamento com o Erbium-YAG fracionado microablativo, com os parâmetros protocolados neste estudo, independente da história pregressa desta infecção.

Tendo como base os resultados imunológicos desse estudo, a administração dos antivirais deveria iniciar no dia do procedimento e se estender por pelo menos 7 dias, mesmo com a rápida re-epitelização demonstrada no controle anátomo-patológico de 3 dias pós-laser. Há relatos na literatura de completa re-epitelização em 12 hs após um tratamento com laser fracionado de 2940nm. (3)

O envelhecimento da região perioral envolve uma série de alterações anatômicas: os lábios perdem a definição e o turgor, há queda das comissuras labiais, a distância entre o nariz e o lábio superior aumenta. Com a perda de colágeno, a pele fica mais fina, o músculo perioral atrofia e as ríides verticais aparecem ao redor da boca. Os sulcos nasogenianos e labiomentonianos acentuam-se pela queda da gordura malar, devido ao enfraquecimento dos ligamentos malar e orbital (109).

Portanto, para um rejuvenescimento rápido e eficaz da região perioral, é necessária a associação de diversas técnicas minimamente invasivas para corrigir especificamente cada alteração do fotoenvelhecimento (110, 111, 112).

Uma sessão com o laser de Erbium-YAG fracionado microablativo, segundo os parâmetros protocolados neste estudo, promove melhora da textura da pele, clareamento de manchas e ameniza rugas finas; teve alta aceitação por parte dos pacientes, já que 95% delas repetiriam o tratamento se fosse necessário. O tratamento mostrou-se bastante seguro, pois apresentou efeitos colaterais transitórios, com rápida recuperação e nenhuma complicação permanente.

7 Conclusão

Os resultados obtidos quanto à realização de uma aplicação do laser de Erbium-YAG fracionado microablativo, para o tratamento das ríides periorais, permitiram-nos as seguintes conclusões:

- ❖ 70% das pacientes apresentaram de leve a boa melhora estética global perioral, devido à melhora da textura da pele, clareamento das pigmentações e atenuação das ríides superficiais.
- ❖ Não se encontraram diferenças estatisticamente significativas entre os valores medianos das fibras colágenas do tipo I ($p = 1,0000$) e tipo III ($p = 0,3125$) antes e após 28 dias do tratamento. Um maior tempo de acompanhamento seria interessante, já que a produção e o remodelamento do colágeno prolongam-se por mais de 28 dias.
- ❖ Apenas 20% das pacientes tiveram melhora importante das ríides periorais e 30% obtiveram melhora na classificação de Baker após 28 dias do tratamento, talvez pelo aumento de outros elementos do tecido conjuntivo dérmico que não foram objetos desse estudo.
- ❖ Houve diferenças estatisticamente significativas entre as medianas dos valores de CD1a ($p = 0,0085$), TLR 2 ($p = 0,0108$), TLR 3 ($p = 0,0011$) e TLR 9 ($p = 0,0012$) na epiderme pré e pós-tratamento com laser de Erbium-YAG fracionado microablativo.

Aplicando-se o pós-teste de Dunn, foi constatado que a significância se deu entre os valores:

- Pré e após 14 dias para CD1a (diminuição);
 - Pré e após 7 dias para TLR 2 (diminuição);
 - Pré e após 14 dias para TLR 3 (aumento);
 - Pré e após 7 dias para TLR 9 (diminuição).
-
- ❖ A diminuição das células de Langerhans e TLRs 2 e 9 poderia ser responsável por uma incidência maior de infecção herpética após a irradiação da pele com laser fracionado microablativo.
 - ❖ 25% das pacientes desenvolveram erupções herpéticas. Destas, 60% sem antecedentes pessoais para a doença, sugerindo que a quimioprofilaxia anti-herpética deva ser realizada em todos os pacientes que se submeterem ao tratamento com o laser fracionado microablativo, com os parâmetros protocolados nesse estudo.
 - ❖ É um procedimento bem tolerado, com índice de dor leve, mesmo sem analgesia, e efeitos colaterais transitórios, mostrando ser bastante seguro por não desenvolver complicações permanentes.

Os autores declaram que não apresentam nenhum conflito de interesse com as empresas fabricante e distribuidora do aparelho mencionado neste estudo.

8 Anexos

Anexo I**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

(Instruções para preenchimento no verso)

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE :.....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M F
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)
2. RESPONSÁVEL LEGAL
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M F
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA : Estudo comparativo da pele pré e pós- laser fracionado minimamente ablativo com Erbium – YAG de 2940nm para tratamento de rírides da região peri-oral : avaliação clínica, histológica e imuno-histoquímica

PESQUISADOR: Dra.Lilian Mayumi Odo

CARGO/FUNÇÃO: Médica dermatologista
101486

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº

UNIDADE DO HCFMUSP: Disciplina de Dermatologia

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO

RISCO MÍNIMO X

RISCO MÉDIO

RISCO BAIXO

RISCO MAIOR

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 6 meses

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA CONSIGNANDO:

1. justificativa e os objetivos da pesquisa – Com o desenvolvimento da tecnologia surgiu um tratamento a laser de Erbium-YAG fracionado para melhorar os sinais de envelhecimento da pele. Apresenta menos complicações que outros tipos de lasers mais antigos porque é minimamente invasivo, mas mais eficientes que os lasers não-ablativos, ou seja, os que não lesam a integridade da camada superficial da pele . O laser fracionado causa uma destruição microscópica na pele deixando pele saudável ao redor, por isso a cicatrização é muito mais rápida. Esse ferimento pelo calor estimula a formação de uma nova pele mais jovem e bonita. Porém esse tratamento pode talvez diminuir temporariamente as defesas da pele e por isso iremos fazer este estudo. Caso seja comprovado essa diminuição da imunidade, poderemos receitar medicamentos antes e após o laser para prevenir infecções na pele, que são muito comuns nestes casos, comprometendo o resultado final do tratamento, além de por em risco a saúde do paciente.

 2. procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais - Aplicação gratuita e única de laser na região ao redor da boca anestesiada previamente com creme de lidocaína. No intra-operatório um jato de ar gelado será empregado junto com os raios lasers para diminuir o incômodo do tratamento. Um pedaço da pele (biópsia) de 3 mm na frente da orelha direita irá ser retirado para estudo microscópico como controle, será feito um sutura com fio bem fino, sendo necessário removê-lo em 5 a 7 dias. A região na frente da orelha esquerda será também tratada com o laser e em outro dia a ser definido pelo pesquisador, iremos fazer um exame de pele, retirando um pedaço de 3mm e suturando, como do lado direito , para estudarmos a reação celular da sua pele após o tratamento. O paciente deverá manter a higiene local com água e sabonete, hidratar a pele com vaselina líquida ou sólida sempre que sentir a pele ressecada, evitar a exposição solar direta e usar protetor solar FPS 30 todos os dias e reaplicar pelo menos 2 vezes ao dia. A vaselina e o protetor solar serão fornecidos pelo pesquisador . Os locais das biópsias deverão ser lavadas com água e sabonete até a completa cicatrização. Fotos serão tiradas dos pacientes antes , 3 dias, 1 semana, 2 semanas e 1 mês após o tratamento, elas serão guardadas nos arquivos do hospital e publicadas no presente estudo.

 3. desconfortos e riscos esperados - Você poderá sentir um ardor durante e logo após o tratamento com duração de algumas horas, a pele pode ficar avermelhada e sensível por 2 dias , Depois deste período a pele fica ressecada e levemente bronzeada, iniciando uma descamação fina que pode durar 1 semana. É possível sentir coceira e aparecer algumas espinhas . Qualquer outra reação como dor intensa, calor e pus no local tratado deverá ser comunicada imediatamente ao pesquisador responsável.

 4. benefícios que poderão ser obtidos - Melhora da qualidade da pele, das rugas finas, clareamento de manchas superficiais e pele mais firme

 5. procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo: Peelings químicos (médio ou profundo), lixamento da pele, outros tipos de lasers ou luz intensa pulsada,
-

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA CONSIGNANDO:

1. acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.

No caso de qualquer dúvida o paciente tem a total liberdade de ligar ou procurar o pesquisador responsável, que deixará o seu telefone e endereço de contato disponível neste termo de consentimento.

2. liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.

Em qualquer momento do estudo o paciente poderá desistir de participar da pesquisa sem prejuízos morais, físicos ou financeiros.

3. salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.

Os resultados serão mostrados neste estudo, mas a identificação dos pacientes será escondida tanto em relação ao nome, quanto nas fotos (só da região peri-oral). Tudo o que acontecer no procedimento e mesmo as intimidades dos pacientes serão guardados em sigilo pelo pesquisador e equipe assistente.

4. disponibilidade de assistência no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa.

Qualquer problema de saúde causado pelo estudo será tratado pelo pesquisador ou especialista indicado sem despesa para o paciente dentro da infra-estrutura do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

5. viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa.

Assistência médica gratuita até a solução dos danos decorrentes da pesquisa.

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Pesquisador responsável: Dra. Lilian Mayumi Odo

Av. Onze de Junho, 88 - cep 04041-000 – Vila Clementino – SP- SP. Tel: (11) 55748599 ou (11) 84329675

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa

São Paulo, de de 19 .

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome Legível)

Anexo II

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
DIRETORIA CLÍNICA
COMISSÃO DE ÉTICA PARA ANÁLISE DE PROJETOS DE PESQUISA -
CAPPesq

CADASTRO DE PROTOCOLO DE PESQUISA

Registro (uso reservado à Secretaria da CAPPesq)

Nº do Protocolo: Data de Entrada :

1. Título do Protocolo de Pesquisa

Estudo comparativo da pele pré e pós- laser fracionado minimamente ablativo com Erbium – YAG de 2940 nm para tratamento de ríides da região peri-oral : avaliação clínica, histológica e imuno-histoquímica

2. Palavras-chaves que caracterizam o assunto da Pesquisa

Células de Langerhans, fototermólise fracionada, laser Erbium-Yag, peri-oral.

3. Resumo do Protocolo de Pesquisa:

Apesar de múltiplos mecanismos de defesa do organismo hospedeiro atuarem contra o herpes simples vírus (HSV), a imunidade mediada por células tem sido considerada como o principal mecanismo de controle e proteção contra esta infecção.

Um grande número de estudos científicos apontaram que a função das células de Langerhans é o elemento essencial no controle da infecção pelo HSV-1 na pele.

Os lasers ablativos de CO2 e Erbium-YAG são os mais utilizados para tratar o fotoenvelhecimento, podendo até remover lesões de pele benignas, pré-malignas e apresentar benefícios profiláticos na prevenção de neoplasias não melanoma , mas o risco de complicações é alto e o tempo de recuperação é prolongado.

Com o desenvolvimento da tecnologia em lasers e a fim de atender as exigências dos pacientes que não podem parar as suas atividades profissionais e sociais, surgiu um novo conceito de tratamento de pele minimamente ablativo, a fototermólise fracionada.

O herpes simples vírus pode ser ativado por procedimentos de resurfacing ablativo a laser, prejudicando a cicatrização da pele e causando sérias complicações no pós-operatório como cicatrizes inestéticas. Medicamentos anti-virais profiláticos são rotineiramente administrados aos pacientes que se submetem ao resurfacing com o intuito de inibir uma reativação dos HSV, porém o tipo de medicamento, dose e duração do tratamento variam conforme a literatura estudada . Os anti-virais são custosos e podem apresentar efeitos colaterais leves a severos. Ainda não há estudos científicos publicados que demonstrem a resposta biológica da imunidade celular da pele no pós-laser fracionado minimamente ablativo, já que esta tecnologia é bastante recente.

A possível diminuição das células de Langerhans na pele após fototermólise fracionada, minimamente ablativa pode comprometer a imunidade celular da pele, aumentando o risco de uma infecção ou reativação do HSV. Desta forma seria prudente e não mais empírico prescrever profilaticamente medicamentos anti-virais orais aos pacientes que serão submetidos a este tipo de tratamento, mesmo que incorra em efeitos colaterais próprios desta classe de drogas.

Este trabalho visa estudar a imunidade celular da pele facial por meio da imunohistoquímica, pré- e pós- fototermólise fracionada minimamente ablativa com o laser Erbium-Yag de 2940nm .

4. Pesquisador Responsável:Dra. Luiz Carlos Cucé.....

5. Pesquisador Executante: ...Dra. Lilian Mayumi Odo.....

6. Orientador: .Prof..Dr. Luiz Carlos Cucé.....

7. Especificação da finalidade acadêmica da pesquisa

Graduação

Pós-graduação

Doutorado
 Mestrado

Outros - especificar :

8. Unidades e Instituições envolvidas (especificar)

- HOSPITAL DAS CLÍNICAS:Ambulatório de Dermatologia.....

- FACULDADE DE MEDICINA USP:Disciplina de Dermatologia.....

- ENTIDADES EXTERNAS: - .

9. Pesquisa:

seres humanos animais (espécie) :

10. Investigação:

Retrospectiva Prospectiva

11. Materiais e métodos:

Laboratorial

Prontuários de pacientes

Peças anatômicas de cadáveres Tecidos, órgãos, fluídos orgânicos

Entrevistas e questionários Outros :

12. A Pesquisa envolve: (preencher mais de um se necessário)

- Isótopo Radioativo, Dispositivo Gerador de Radiação Ionizantes
- Microorganismos Patogênicos
- Ácidos Nucleares Recombinantes
- Outros (especificar) :

13. Existe algum risco ambiental e/ou biológico com o descarte dos sub-produtos e/ou reagentes de sua pesquisa?

- SIM NÃO

14. Pesquisa em áreas temáticas especiais:

- genética humana;
- reprodução humana;
- fármacos, medicamentos, vacinas e testes diagnósticos novos ou não;
- equipamentos, insumos e dispositivos para a saúde novos, ou não registrados no país;
- novos procedimentos ainda não consagrados na literatura;
- populações indígenas;
- projetos que envolvam aspectos de biossegurança;
- pesquisas coordenadas do exterior ou com participação estrangeira e pesquisas que envolvam remessa de material biológico para o exterior.

15. Gênero da pesquisa:

- Clínica (Fisiopatológico, Terapêutico,Diagnóstico)
- Cirúrgica (Fisiopatológico, Terapêutico, Diagnóstico)
- Experimental (Fisiopatológico, Terapêutico,Diagnóstico)
- Anatômica
- Epidemiológica
- Teórica

16. Patrocínio

Recursos Financeiros Solicitados

Instituições	Valores	Instituições	Valores
CNPq	-	Fundo Pesquisa FEJZ.	-
FINEP	-	HC-FMUSP	-
CAPES	-	Indústrias:	-
FAPESP	-	Laboratórios:	-
F.F.M.	-	Outros: Pesquisador	-

17. Existência de infra-estrutura e recursos humanos para desenvolvimento da pesquisa (especificar).

O laser Erbium-YAG fracionado minimamente ablativo de 2940nm será cedido pela empresa LBT lasers para o estudo. O pesquisador irá fazer a aplicação do laser no HC em dias específicos reservados para a pesquisa, bem como a realização das biópsias de controle e as orientações pré-tratamento aos pacientes. As biópsias e o seguimento clínico pós-tratamento serão realizados no ambulatório de dermatologia do Hospital das Clínicas da FMUSP pelo pesquisador.

18. Cronograma de execução da pesquisa

início: __15 / __Janeiro / __2007 (Se aprovado pela CAPPesq)
 término: __15 / __Julho / __2007__

Prazo: 6 meses

18. Parecer da Comissão de Pesquisa e/ou de Ética do Departamento da FMUSP ou da entidade envolvida.

19. Conselho de Departamento da FMUSP

Assinatura
Carimbo

Aprovado em ____/____/____.

20. Parecer do Serviço de Verificação de Óbitos da Capital-SVOC, no caso de pesquisas realizadas em peças anatômicas de cadáveres necropsiados naquele Serviço.

Assinatura
Carimbo

Aprovado em ____/____/____.

/tsc.

Anexo III

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
DIRETORIA CLÍNICA
COMISSÃO DE ÉTICA PARA ANÁLISE DE PROJETOS DE PESQUISA
CAPPesq

CADASTRO DO PESQUISADOR

1. Identificação e qualificação do pesquisador:

Nome: ..Lilian Mayumi Odo..... RG: .26120633-3.....

CPF: .205373478-79.....Profissão:Médica.....

Endereço: .Av. Onze de Junho,269.....

CEP: .04041-000..... Telefone: ..55-11-55723420.....

2. Graduado em ...Medicina Data: 14/11/2000.....

Instituição....Faculdade de Medicina do ABC.....

3. Titulação acadêmica mais elevada: Médica especialista em dermatologia há 3 anos

4. Vinculação Profissional Atual

HC

FMUSP

Outras Instituições:

Função: Dermatologista .

Lotação:Clínica de dermatologia privada

5. Vinculação Acadêmica Atual

Graduação

Pós-Graduação

.Doutorado:

Mestrado

Outras - especificar: Dermatologista assistente voluntária do ambulatório de cosmiatria e cirurgia dermatológica da Universidade de Santo Amaro, há 3 anos.

6. Área do conhecimento : ...Cosmiatria , laser, cirurgia dermatológica.

7. Relação de Co-autores

Dr. Luiz Carlos Cucé	

8. Resumo do Currículo

- . Utilizar este campo abaixo para ressaltar, em síntese, os aspectos que o capacitam para a pesquisa.
- . Não serão aceitos anexos.

1-Médica formada pela Faculdade de Medicina do ABC.Período : 1995 a 2000
2-Estágio de Dermatologia na Universidade de Santo Amaro em regime de residência médica.Serviço do Prof. Luiz Carlos Cucé. Período : 2001 a 2003
3-Estágio de Cosmiatria e Cirurgia Dermatológica na Universidade de Santo Amaro
 Serviço do Prof. Luiz Carlos Cucé. Período : 2003 a 2004
4-Aprovada no XXXVII Exame de Título de Especialista em Dermatologia .Sociedade Brasileira de Dermatologia e Associação Médica Brasileira. Rio de Janeiro – Abril de 2003
5-Estágio em Avanços Tecnológicos em Terapia Dermatológica Hokkaido University Graduate School of Medicine, Sapporo, Japão. Bolsista da Japan Internacional Cooperation Agency – Setembro a Dezembro de 2004
6-Estágio em Cicatrizaçã de pele (Clinical Attachment in Wound Healing) Universidade de Boston, MA, EUA .10 de Abril a 30 de Junho de 2006
7-Dermatologista assistente voluntária do ambulatório de cosmiatria e cirurgia dermatológica da Universidade de Santo Amaro. Desde 2004
8-Coordenadora do curso prático: Tratamento de pêlos facial e telangiectasias com 1064nm laser. Sociedade Brasileira de Dermatologia.VIII RADESP – SP, 2003
9-Membro efetivo da Sociedade Brasileira de Dermatologia, Sociedade Brasileira de Cirurgia Dermatológica, *American Academy of Dermatology*.

PUBLICAÇÃO: Odo LM, Odo MEY. Nova modalidade de luz intensa pulsada no rejuvenesci-mento facial. In: Procedimentos minimamente invasivos. 1ª ed. São Paulo, editora Santos, capítulo 35, p.261-67, 2005

PALESTRANTE:

- I Annual Meeting of Aesthetic Procedures, julho de 2005. “ Luz intensa pulsada – novo modelo no rejuvenescimento facial ”
- 10ª RADESP, dezembro de 2005. “Curso prático: Técnicas de rejuvenescimento de membros superiores”
- Curso teórico CT1- Dermatocosmiatria I – Congresso Brasileiro de Dermatologia, setembro de 2006. “ Blefaroplastia com fenol ”
- Terapêutica do Couro Cabeludo e Unhas – XII Reunião Internacional de Terapêutica Dermatológica, outubro de 2006. “ Tratamento da Alopecia Areata ”

CURSOS DE LASER:

- 26th Annual Meeting of American Society for Lasers Medicine and Surgery
Hynes Convention Center, Boston – MA. Abril de 2006
- Curso de Laser and Aesthetic Skin Therapy: What's the Truth?
Wellman Center of Photomedicine – MGH. Simches Research Building – Boston, MA. Setembro de 2006

PÔSTERS CIENTÍFICOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS:

- “ Técnicas Complementares na Cirurgia de Pálpebra ”
- “ Blefaroplastia como Tratamento de Endotriquia ”
- “ Complicações de preenchimento facial com poliacrilamida ” - 1º lugar como pôster de mini-caso
- “ Associação de técnicas minimamente invasivas para melhorar o contorno facial ”
- “ Uso de implantes para aumento da região mentoniana ”
- “ Efeito colateral da luz intensa pulsada no tratamento de víbices ”
- “ Tratamento de grânulos de Fordyce com terapia fotodinâmica ”
- “ Blefaroplastia química com fenol ”
- “ Fio filit: Fio de polipropileno barbado para lifting de terço médio da face ”

/tsc.

Anexo IV

Nº Protocolo :

Nome:

Idade:

Fototipo: I II III IV V VI

Tipo de ruga (BAKER 1998) pré laser: I II III

Tels de contato:

Assinar termo de consentimento:

Data do tratamento:

Foto pré:
Foto 72h:
Foto 1 semana:
Foto 2 semanas:
Foto 1 mês

História de herpes labial:

Medicações em uso:

Biópsia pré:
Biópsia 72 h :
Biópsia 1 semana:
Biópsia 2 semanas:
Biópsia 1 mês:

Escala de dor tratamento (0-10):

Complicações	Imediato	72h	1 semana	2 semanas	1 mês
Ardor / Dor					
Eritema					
Edema					
Ressecamento					
Descamação					
Prurido					
Hipocromia					
Hipercromia					
Cicatrizes					
Herpes simples					
Infecção bacteriana					
Erupção acneiforme					
Outros					

Grau de satisfação após 1 mês:

Insatisfeita	Pouco satisfeita	Satisfeita	Muito Satisfeita
Recomendaria o laser para outras pessoas?		SIM	NÃO
Repetiria o tratamento se fosse necessário. ?		SIM	NÃO
Se sente mais atraente?		SIM	NÃO
Melhorou sua auto-estima?		SIM	NÃO

Avaliação clínica após 1 mês:

Global Aesthetic Improvement Scale (GAIS)

Índice	Descrição
Muito boa melhora	Resultado cosmético ótimo do laser
Boa melhora	Melhora marcante da aparência, mas uma complementação seria bom para um toque final
Leve melhora	Melhora da aparência, mas um retratamento está indicado
Sem melhora	A aparência pós laser é igual a original
Piora	A aparência é pior do que a condição original

Classificação de rugas peri-orais (Baker 1998) após 1 mês:

Tipo	Profundidade	Localização	Nº de rugas
I	Superficiais	1/3 a 1/2 do lábio superior	≤ 8
II	Moderadas	Mais de 2/3 do lábio superior	9 a 15
III	Profundas	Lábios superior e inferior, mento	≥ 16

COMISSÃO DE ÉTICA PARA ANÁLISE DE PROJETOS DE PESQUISA
FORMULÁRIO PARA ENCAMINHAMENTO DE EVENTO ADVERSO

I) Título do Protocolo de Pesquisa e nº CAPPesq:

Estudo comparativo da pele pré- e pós- laser fracionado minimamente ablativo com Erbium – YAG de 2940 nm para tratamento de ríides da região peri-oral :
avaliação clínica, histológica e imuno-histoquímica

II) Dados do Pesquisador Responsável:

Nome.: Lilian Mayumi Odo

Departamento/Serviço: Departamento de Dermatologia do HCFMUSP

III) Eventos adversos comunicados:

1. eritema transitório leve
2. edema transitório leve
4. erupção acneiforme
5. hiper Cromica
6. -----

IV) Responda as informações abaixo a respeito de cada um dos eventos adversos comunicados:

EVENTO	Ocorreu dentro deste Projeto? (SIM ou NÃO)	Ocorreu em outro centro que está realizando o mesmo estudo? (SIM ou NÃO) Se sim, qual país?	Ocorreu em outro estudo usando o mesmo medicamento ou procedimento? (SIM ou NÃO)	Na sua opinião, o evento adverso comunicado está relacionado com o procedimento do estudo? (SIM ou NÃO)	O estudo sob sua responsabilidade ou o TCLE irá sofrer alguma mudança devida a este evento? (SIM ou NÃO)*	Houve morte, internação ou seqüela grave associada ao evento adverso? (SIM ou NÃO)
1.	NÃO	NÃO	SIM	SIM	NÃO	NÃO
2.	NÃO	NÃO	SIM	SIM	NÃO	NÃO
3.	NÃO	NÃO	SIM	SIM	NÃO	NÃO

EVENTO	Ocorreu dentro deste Projeto? (SIM ou NÃO)	Ocorreu em outro centro que está realizando o mesmo estudo? (SIM ou NÃO) Se sim, qual país?	Ocorreu em outro estudo usando o mesmo medicamento ou procedimento? (SIM ou NÃO)	Na sua opinião, o evento adverso comunicado está relacionado com o procedimento do estudo? (SIM ou NÃO)	O estudo sob sua responsabilidade ou o TCLE irá sofrer alguma mudança devida a este evento? (SIM ou NÃO)*	Houve morte, internação ou seqüela grave associada ao evento adverso? (SIM ou NÃO)
4.	NÃO	NÃO	SIM	SIM	NÃO	NÃO
5.	NÃO	NÃO	SIM	SIM	NÃO	NÃO
6.	-	-	-	-	-	-

Utilizar folha extra, se necessário.

V) Comente os casos de morte, internação ou seqüelas graves apontados na tabela acima. -----

VI) Outros comentários:

Todos os eventos adversos relatados foram leves e transitórios, sem seqüelas severas, permanentes ou fatais. Tais complicações se resolveram mesmo sem tratamento específico.

VII) Decisão do Pesquisador Responsável sobre a continuação ou não da pesquisa, diante dos eventos adversos relatados.
Continuar a pesquisa.

*** Caso tenha havido alguma mudança do seu projeto de pesquisa ou no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, anexar a nova documentação.**

Data 26.../..10.../...2006

Assinatura do Pesquisador Responsável:

INSTRUÇÕES PARA PREENCHIMENTO
(Resolução Conselho Nacional de Saúde 196, de 10 outubro 1996)

1. Este termo conterà o registro das informações que o pesquisador fornecerá ao sujeito da pesquisa, em linguagem clara e acessível, evitando-se vocábulos técnicos não compatíveis com o grau de conhecimento do interlocutor.
2. A avaliação do grau de risco deve ser minuciosa, levando em conta qualquer possibilidade de intervenção e de dano à integridade física do sujeito da pesquisa.
3. O formulário poderá ser preenchido em letra de forma legível, datilografia ou meios eletrônicos.
4. Este termo deverá ser elaborado em duas vias, ficando uma via em poder do paciente ou seu representante legal e outra deverá ser juntada ao prontuário do paciente.
5. A via do Termo de Consentimento Pós-Informação submetida à análise da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa -CAPPesq deverá ser idêntica àquela que será fornecida ao sujeito da pesquisa.

9 Referências

1. Iyer S et.al. Full face laser resurfacing: therapy and prophylaxis for actinic keratosis and non-melanoma skin cancer. *Lasers Surg Med.* 2004; 34(2):114-9.
2. Lent WM, David LM. Laser resurfacing: a safe and predictable method of skin resurfacing. *J Cutan Laser Ther.* 1999; 1(2):87-94.
3. Dierickx CC, Khatri KA, Tannous ZS, et al. Micro-fractional ablative skin resurfacing with two novel erbium laser systems. *Lasers Surg Med.* 2008; 40(2):113-23.
4. Hedelund L et.al. Ablative versus non-ablative treatment of perioral rhytides. A randomized controlled trial with long-term blinded clinical evaluations and non-invasive measurements. *Lasers Surg Med.* 2006;38(2):129-36.
5. Laubach HJ et.al. Skin response to fractional photothermolysis. *Lasers Surg Med.* 2006;38(2):142-9.
6. Manstein D et.al. Fractional photothermolysis: a new concept for cutaneous remodeling using microscopic patterns of thermal injury. *Lasers Surg Med.* 2004; 34(5): 426-38.
7. Keller GS. Fractional ablative skin resurfacing with Pixel laser. Geffen School of Medicine University of California. Disponível em: < www.lbtlasers.com.br >. Acesso em 17 agosto 2006.
8. Trelles MA, Mordon S, Velez M, Urdiales F, Levy JL. Results of fractional ablative skin resurfacing with the erbium:yttrium-aluminium-garnet laser 1 week and 2 months after single treatment in 30 patients. *Lasers Med Sci.* 2008; 24(2):186-94.

9. Tierney EP, Kouba DJ, Hanke CW. Review of fractional photothermolysis: treatment indications and efficacy. *Dermatol Surg.* 2009;35(10):1445-61.
10. Hantash BM, Bedi VP, Kapadia B, Rahman Z, Jiang K, Tanner H, Chan KF, Zachary CB. In vivo histological evaluation of a novel ablative fractional resurfacing device. *Lasers Surg Med.* 2007;39(2):96-107.
11. Geronemus, RG. Fractional Photothermolysis: current and future applications. *Lasers Surg Med.* 2006;38(3):169-79.
12. Behroozan DS et.al. Fractional photothermolysis for the treatment of surgical scars: a case report. *J Cosmet Laser Ther.* 2006; 8(1):35-8.
13. Hasegawa T et.al. Clinical trial of a laser device called fractional photothermolysis system for acne scars. *J Dermatol.* 2006; 33(9):623-7.
14. Rokhsar CK, Fitzpatrick RE. The treatment of melasma with fractional photothermolysis: a pilot study. *Dermatol Surg.* 2005; 31(12):1645-50.
15. Karsai S, Hammes S, Rutten A, Raulin C. Fractional photothermolysis for the treatment of granuloma annulare: a case report. *Lasers Surg Med.* 2008; 40:319–322.
16. Izikson, L, Anderson RR. Resolution of blue minocycline pigmentation of the face after fractional photothermolysis. *Lasers Surg Med.* 2008; 40:399–401.
17. Glaich AS, Goldberg LH, Dai T, Kunishige JH, Friedman PM. Fractional resurfacing: A new therapeutic modality for Becker's nevus. *Arch Dermatol.* 2007; 143 (12):1488-90.
18. Kouba DJ, Fincher EF, Moy RL. Nevus of Ota successfully treated by fractional photothermolysis using a fractionated 1440-nm Nd:YAG laser. *Arch Dermatol.* 2008;144 (2):156-8.

19. Akita H, Takasu E, Washimi Y, Sugaya N, Nakazawa Y, Matsunaga K. Syringoma of the face treated with fractional photothermolysis. *J Cosmet Laser Ther.* 2009;11(4):216-9.
20. Behroozan DS et.al. Fractional photothermolysis for treatment of poikiloderma of civatte. *Dermatol Surg.* 2006;32(2):298-301.
21. Lin JY, Chan HH. Pigmentary disorders in asian skin: treatment with laser and intense pulsed light sources. *Skin Therapy Lett.* 2006; 11(8):8-11.
22. Jih MH, Goldberg LH, Kimyai-Asadi A. Fractional Photothermolysis for Photoaging of Hands. *Dermatol Surg.* 2008;34:73–78.
23. Fisher GH, Geronemus RG. Short-term side effects of fractional photothermolysis. *Dermatol Surg.* 2005; 31(9 Pt 2):1245-9, discussion 1249.
24. Mamelak AJ, Goldberg LH, Marquez D, Hosler GA, Hinckley MR, Friedman PM. Eruptive keratoacanthomas on the legs after fractional photothermolysis: report of two cases. *Dermatol Surg.* 2009;35:513–518
25. Graber EM, Tanzi EL, Alster TS. Side effects and complications of fractional laser photothermolysis: experience with 961 treatments. *Dermatol Surg.* 2008; 34(3):301-5; discussion 305-7.
26. Fenske NA, Lober CW. Structural and functional changes of normal aging skin. *J Am Acad Dermatol.* 1986 Oct;15(4 Pt 1):571-85.
27. Glogau RG. Aesthetic and anatomic analysis of the aging skin. *Sem Cutan Med Surg.* 1996; 15(3):134-8
28. Fisher GJ, Wang ZQ, Datta SC, Varani J, Kang S, Voorhees JJ. Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. *N Engl J Med.* 1997; 337(20):1419-28.

29. Quan T, Qin Z, Xia W, Shao Y, Voorhees JJ, Fisher GJ. Matrix-degrading metalloproteinases in photoaging. *J Investig Dermatol Symp Proc.* 2009;14(1):20-4.
30. Fisher GJ, Voorhees JJ. Molecular mechanisms of photoaging and its prevention by retinoic acid: ultraviolet irradiation induces MAP kinase signal transduction cascades that induce Ap-1-regulated matrix metalloproteinases that degrade human skin in vivo. *J Investig Dermatol Symp Proc.* 1998;3(1):61-8.
31. Morita A. Tobacco smoke causes premature skin aging. *J Dermatol Sci* 2007; 48:169-175.
32. Paes EC, Teepen HJ, Koop WA, Kon M. Perioral wrinkles: histologic differences between men and women. *Aesthet Surg J.* 2009;29(6):467-72.
33. Lorenzi JCC, Coelho-Castelo AAM. Resposta imune contra infecções virais. *Revista Campus.* 2008;1(1):23-35.
34. Tang Y, Yuan J, Ösapay G, Ösapay K, Tran D, Miller CJ, Ouellette AJ, Selsted MEA. Cyclic antimicrobial peptide produced in primate leukocytes by the ligation of two truncated –defensins. *Science.* 1999; 286(5439):498–502.
35. Pivarcsi A, Bodai L, Réthi B, Kenderessy-Szabó A, Koreck A, Széll M, Beer Z, Bata-Csörgö Z, Magócsi M, Rajnavölgyi E, Dobozy A, Kemény L. Expression and function of Toll-like receptors 2 and 4 in human keratinocytes. *Int Immunol.* 2003 Jun;15(6):721-30.
36. Ospelt C, Gay S. TLRs and chronic inflammation. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009 Oct 17. [Epub ahead of print]
37. Netea MG, Van Der Graaf C, Van Der Meer JW, Kullberg BJ. Toll-like receptors and the host defense against microbial pathogens: bringing specificity to the innate-immune system. *J Leukoc Biol.* 2004 May;75(5):749-55.

38. miller LS. Toll-like receptors in skin. *Adv Dermatol.* 2008;24:71-87.
39. Lai Y, Gallo RL. Toll-like receptors in skin infections and inflammatory diseases. *Infect Disord Drug Targets.* 2008 Sep;8(3):144-55.
40. Takeda K, Akira S. Roles of Toll-like receptors in innate immune responses. *Genes Cells.* 2001 Sep;6(9):733-42.
41. Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors as adjuvant receptors. *Biochim Biophys Acta.* 2002 Feb 13;1589(1):1-13.
42. Flacher V, Bouschbacher M, Verronese E, Massacrier C, Sisirak V, Berthier-Vergnes O, De Saint-Vis B, Caux C, Dezutter-Dambuyant C, Lebecque S, Valladeau J. Human Langerhans cells express a specific TLR profile and differentially respond to viruses and Gram-positive bacteria. *J Immunol.* 2006 Dec 1;177(11):7959-67.
43. Renn CN, Sanchez DJ, Ochoa MT, Legaspi AJ, Oh CK, Liu PT, Krutzik SR, Sieling PA, Cheng G, Modlin RL. TLR activation of Langerhans cell-like dendritic cells triggers an antiviral immune response. *J Immunol.* 2006 Jul 1;177(1):298-305.
44. Compton T, Kurt-Jones EA, Boehme KW, Belko J, Latz E, GOLENBOCK DT et al. Human cytomegalovirus activates inflammatory cytokine responses via CD14 and Tolllike receptor 2. *J Virol.* 2003;77(8):4588-96.
45. Wang JP, Kurt-Jones EA, Shin OS, Manchak MD, Levin MJ, Finberg RW. Varicella-zoster virus activates inflammatory cytokines in human monocytes and macrophages via Toll-like receptor 2. *J Virol.* 2005;79(20): 12658-66.
46. Brentano F, Schorr O, Gay RE, Gay S, Kyburz D. RNA released from necrotic synovial fluid cells activates rheumatoid arthritis synovial fibroblasts via Toll-like receptor 3. *Arthritis Rheum.* 2005;52(9):2656-65.

47. Patole PS, Grone HJ, Segerer S, Ciubar R, Belemzova E, Henger A et al. Viral double-stranded RNA aggravates lupus nephritis through Toll-like receptor 3 on glomerular mesangial cells and antigen-presenting cells. *J Am Soc Nephrol*. 2005;16(5):1326–38.
48. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*. 2000;408(6813):740–5.
49. Petry V, Gaspari AA. Toll-like receptors and dermatology. *Int J Dermatol*. 2009 Jun;48(6):558-70.
50. Köllisch G, Kalali BN, Voelcker V, Wallich R, Behrendt H, Ring J, Bauer S, Jakob T, Mempel M, Ollert M. Various members of the Toll-like receptor family contribute to the innate immune response of human epidermal keratinocytes. *Immunology*. 2005 Apr;114(4):531-41.
51. Kluwe J, Mencin A, Schwabe RF. Toll-like receptors, wound healing, and carcinogenesis. *J Mol Med*. 2009 Feb;87(2):125-38.
52. Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitov R. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell*. 2004;118(2):229–41.
53. Sprecher E, Becker Y. Role of Langerhans cells and Thy.1+ effector cells in herpes simplex virus-1 infection in the skin of newborn mice. *Arch Virol*. 1988;100: 285-292.
54. Murphy GF. Histology of the skin. In: Elder D et.al. *Lever's histopathology of the skin*. 8ª ed. Philadelphia:Lippincott-Raven, 1997. 5-50.
55. Sampaio SAP, Rivitti EA. Anatomia e fisiologia. In: Sampaio SAP, Rivitti EA. *Dermatologia*. 2ª ed. São Paulo:Artes Médicas, 2001. 3-35.

56. Cunningham AL, Carbone F, Geijtenbeek TBH. Langerhans cells and viral immunity. *Eur J Immunol.* 2008; 38:2377-85.
57. Valladeau J, Saeland S. Cutaneous dendritic cells. *Semin Immunol.* 2005; 17(4):273-83.
58. Otani T, Mori R. The effects of ultra-violet irradiation of the skin on herpes simplex virus infection: alteration in immune function mediated by epidermal cells and in the course of infection. *Arch Virol.* 1987; 96:1-15.
59. Meski APG. *Estudo comparativo de pele pré- e pós-quimioabrasão para tratamento de ríides da região perioral: avaliação clínica e imuno-histoquímica* (dissertação). São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2005.
60. Salgado AGM. *Estudo imuno-histoquímico da pele antes e depois do laser de CO2 ultrapulsado* (dissertação). São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2001.
61. Sprecher E, Becker Y. Langerhans cell density and activity in mouse skin and lymph nodes affect herpes simplex 1 (HSV-1) pathogenicity. *Arch Virol.* 1989; 107: 191-205.
62. Gilbert S. Improving the outcome of facial resurfacing-prevention of herpes simplex virus type 1 reactivation. *J Antimicrob Chemother.* 2001; 47 Suppl T1:29-34.
63. Apfelberg DB. Ultrapulse carbon dioxide laser with CPG scanner for full-face resurfacing for rhytids, photoaging, and acne scars. *Plast Reconstr Surg.* 1997;99(7):1817-25.
64. Beeson WH, Rachel JD. Valacyclovir prophylaxis for herpes simplex virus infection or infection recurrence following laser skin resurfacing. *Dermatol Surg.* 2002; 28(4):331-6.

65. Bisaccia E, Scarborough D. Herpes simplex virus prophylaxis with famciclovir in patients undergoing aesthetic facial CO2 laser resurfacing. *Cutis*. 2003; 72(4):327-8.
66. Wall SH, Ramey SJ, Wall F. Famciclovir as antiviral prophylaxis in laser resurfacing procedures. *Plast Reconstr Surg*. 1999;104(4):1103-8, discussion 1109.
67. Gilbert S, Mcburney E. Use of valacyclovir for herpes simplex virus-1 (HSV-1) prophylaxis after facial resurfacing: A randomized clinical trial of dosing regimens. *Dermatol Surg*. 2000; 26(1):50-4.
68. Mori T et al. Prevention of cytomegalovirus infection by valacyclovir after allogeneic bone marrow transplantation from an unrelated donor. *Int J Hematol*. 2006; 83(3):266-70.
69. Hellden A et al. The acyclovir metabolite CMMG is detectable in the CSF of subjects with neuropsychiatric symptoms during acyclovir and valacyclovir treatment. *J Antimicrob Chemother*. 2006; 57(5):945-9.
70. Pacheco LR et al. Acute renal failure related to intravenous acyclovir. *Rev Assoc Med Bras*. 2005; 51(5):275-8.
71. Carlon R, Possamai C, Corbanese U. Acute renal failure and severe neurotoxicity following valacyclovir. *Intensive Care Med*. 2005; 31(11):1593.
72. Yasumoto S, Okabe N, Mori R. Role of epidermal langerhans cells in resistance to herpes simplex virus infection. *Arch Virol*. 1986; 90: 261-271.
73. Becker Y. Immunological and regulatory functions of uninfected and virus infected immature and mature subtypes of dendritic cells - a review. *Virus Genes* 2003; 26(2):119-130.

74. Alexiades-Armenakas MR, Dover JS, Arndt KA. The spectrum of laser skin resurfacing: nonablative, fractional and ablative laser resurfacing. *J Am Acad Dermatol.* 2008; 58(5):719-37
75. Trelles MA, Velez M, Mordon S. Correlation of histological findings of single session Er:YAG skin fractional resurfacing with various passes and energies and the possible clinical implications. *Lasers Surg Med.* 2008; 40(3):171-7.
76. Disponível em <http://www.lbtlasers.com.br/prod_harmonypixel.html> Acesso em 10 out. 2008.
77. Christiansen K, Bjerring P. Low density, non-ablative fractional CO2 laser rejuvenation. *Lasers Surg Med.* 2008; 40:454-60.
78. Chan HH, Manstein D, Yu CS, Shek S, Kono T, Wei WI. The prevalence and risk factors of post-inflammatory hyper-pigmentation after fractional resurfacing in Asians. *Lasers Surg Med.* 2007; 39(5):381-5.
79. Carvalho DS, Kowacs PA. Avaliação da intensidade da dor. *Migrâneas cefaléias.* 2006; 9(4):164-8.
80. Baker TM. Dermabrasion as a complement to aesthetic surgery. *Clin Plast Surg.* 1998; 25:81-8.
81. Carruthers A, Carruthers J. Evaluation of injectable calcium hydroxylapatite for the treatment of facial lipoatrophy associated with human immunodeficiency virus. *Dermatol Surg.* 2008; 34(11):1486-99.
82. Parrish JA, Anderson RR, Harrist T, Paul B, Murphy GF. Selective thermal effects with pulsed irradiation from lasers: from organ to organelle. *J Invest Dermatol.* 1983; 80 Suppl:75s-80s.
83. Jih MH, Kimyai-Asadi A. Fractional photothermolysis: a review and update. *Semin Cutan Med Surg.* 2008; 27:63-71.

84. Irion G. Cicatrização normal. In: Irion G. *Feridas: novas abordagens, manejo clínico e atlas em cores*. Rio de Janeiro: LAB, 2005;18-25
85. Avram MM, Tope WD, Yu T, Szachowicz E, Nelson JS. Hypertrophic scarring of the neck following ablative fractional carbon dioxide laser resurfacing. *Lasers Surg Med*. 2009; 41:185–188.
86. Fife DJ, Fitzpatrick RE, Zachary CB. Complications of Fractional CO2 Laser Resurfacing: Four Cases. *Lasers Surg Med*. 2009; 41:179–184
87. Alster TS; Lupton, JR. Erbium:YAG cutaneous laser resurfacing. *Dermatol Clin*. 2001; 19(3):453-66.
88. Stuzin JM, Baker TJ, Baker TM. A controlled evaluation of dermabrasion versus CO2 laser resurfacing for the treatment of perioral wrinkles (Discussion). *Plast Reconstr Surg*. 2000; 106(6):1373-4
89. Lapidoth M, Odo MEY, Odo LM. Novel use of erbium-YAG (2940nm) laser for fractional ablative photothermolysis in the treatment of photodamaged facial skin: a pilot study. *Dermatol Surg*. 2008; 34(8):1048-53.
90. Smith BD. Expression and regulation of the collagen family in skin. In: Falanga V. *Cutaneous wound healing*. London: Martin Dunitz, 2001; 57-80
91. Fisher GH et.al. Concurrent use of handheld forced cold air device minimizes patient discomfort during fractional photothermolysis. *Dermatol Surg*. 2005; 31(9 Pt 2):1242-3, discussion 1244.
92. Mandy S. Tretinoin in the preoperative and postoperative management of dermabrasion. *J Am Acad Dermatol*. 1986; 15:878-9.
93. Weinstein C. Carbon dioxide laser resurfacing: long-term follow up in 2123 patients. *Clin Plast Surg*. 1998;25:109-30.

94. Bulengo-Ransby SM, Griffiths CE, Kimbrough-Green CK et al. Topical tretinoin (retinoic acid) therapy for hyperpigmented lesions caused by inflammation of the skin in black patients. *N Engl J Med*. 1993; 328(20):1438-43.
95. Krug A, Luker GD, Barchet W, Leib DA, Akira S, Colonna M. Herpes simplex virus type 1 activates murine natural interferon-producing cells through toll-like receptor 9. *Blood*. 2004; 103(4):1433-7
96. Van Dommelen SL, Sumaria N, Schreiber RD, Scalzo AA, Smyth MJ, Degli-Esposti MA. Perforin and granzymes have distinct roles in defensive immunity and immunopathology. *Immunity*. 2006; 25(5):835-848.
97. Loser K, Beissert S. Dendritic cells and T cells in the regulation of cutaneous immunity. *Advances in dermatology*. 2007; 23:307-333.
98. Wolska A, Lech-Marañda E, Robak T. Toll-like receptors and their role in carcinogenesis and anti-tumor treatment. *Cell Mol Biol Lett*. 2009;14(2):248-72.
99. Barber GN. Host defense, viruses and apoptosis. *Cell Death Differ*. 2001; 8(2):113-26, 2001.
100. Rasmussen SB et al. Herpes simplex virus infection is sensed by both Toll-like receptors and retinoic acid-inducible gene-like receptors, which synergize to induce type I interferon production. *J Gen Virol*. 2009 Jan;90(Pt 1):74-8.
101. Kurt-Jones EA, Chan M, Zhou S, Wang J, Reed G, Bronson R, Arnold MM, Knipe DM, Finberg RW. Herpes simplex virus 1 interaction with Toll-like receptor 2 contributes to lethal encephalitis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(5):1315-20.
102. Zhang SY et al. TLR3 Deficiency in Patients with Herpes Simplex Encephalitis. *Science*. 2007; 317(5844):1522-7.

103. Lund J, Sato A, Akira S, Medzhitov R, Iwasaki A. Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med*. 2003 Aug 4;198(3):513-20.
104. Ghaznawie M, Papadimitriou JM, Heenan PJ. The repopulation of murine Langerhans cells after depletion by mild heat injury. *Br J Dermatol*. 1999; 141: 206-210.
105. Schaubert J et al. Injury enhances TLR2 function and antimicrobial peptide expression through a vitamin D-dependent mechanism. *J. Clin. Invest*. 2007;117:803–811.
106. Miller LS, Sørensen OE, Liu PT, Jalian HR, Eshtiaghpour D, Behmanesh BE, Chung W, Starner TD, Kim J, Sieling PA, Ganz T, Modlin RL. TGF- α regulates TLR expression and function on epidermal keratinocytes. *J. Immunol*. 2005;174:6137-6143.
107. Patole PS, Gröne HJ, Segerer S, Ciubar R, Belemzova E, Henger A, Kretzler M, Schlöndorff D, ANDERS HJ. Viral double-stranded RNA aggravates lupus nephritis through Toll-like receptor 3 on glomerular mesangial cells and antigen-presenting cells. *J Am Soc Nephrol*. 2005;16(5):1326-38.
108. Ospelt C, Brentano F, Rengel Y, Stanczyk J, Kolling C, Tak PP, Gay RE, Gay S, Kyburz D. Overexpression of toll-like receptors 3 and 4 in synovial tissue from patients with early rheumatoid arthritis: toll-like receptor expression in early and longstanding arthritis. *Arthritis Rheum*. 2008;58(12):3684-92.
109. Perkins SW, Sandel IV HD. Anatomic considerations, analysis, and the aging process of the perioral region. *Facial Plast Surg Clin N Am*. 2007; 15:403–407.
110. Alexiades-Armenakas M. Rhytides, laxity, and photoaging treated with a combination of radiofrequency, diode laser, and pulsed light and assessed with a comprehensive grading scale. *J Drugs Dermatol*. 2006;5(8):731-8.

-
111. Ascher B, ROSSI B. Botulinum toxin and wrinkles: few side effects and effective combining procedures with other treatments. *Ann Chir Plast Esthet.* 2004 Oct;49(5):537-52.
 112. Fezza JP. Laserabrasion: the combination of carbon dioxide laser and dermasanding. *Plast Reconstr Surg.* 2006; 118(5):1217-21, discussion 1222-3.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)