

CRIOCIRURGIA EM ODONTOLOGIA: VANTAGENS E DESVANTAGENS

CRYOSURGERY IN DENTISTRY: ADVANTAGES AND DISADVANTAGES

MATHEUS BENJAMIN **BENAGLIA**¹, ELLEN CRISTINA GAETTI **JARDIM**^{2*}, JOSE CARLOS GARCIA **DE MENDONÇA**³

1. Graduado em odontologia, pela Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (FAODO/UFMS); especialista em Cirurgia e Traumatologia Bucocomaxilofacial (CTBMF) pelo Colégio Brasileiro de Cirurgia e Traumatologia Bucocomaxilofacial; ex-residente em CTBMF no Hospital Universitário “Maria Aparecida Pedrossian” da UFMS; mestrando do programa de pós-graduação da FAODO/UFMS; 2. Graduada em Odontologia, pela Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista (UNESP); mestre em Estomatologia e em Cirurgia e Traumatologia Bucocomaxilofacial (CTBMF), pela UNESP; doutora em CTBMF, pela UNESP; ex-residente em CTBMF no Hospital Universitário “Maria Aparecida Pedrossian” da UFMS; professora voluntária do Núcleo do Hospital Universitário da UFMS; 3. Especialista em Cirurgia e Traumatologia Bucocomaxilofacial (CTBMF); mestre em Ciências da Saúde, pela Universidade de Brasília – UnB; doutor em Ciências da Saúde (CTBMF), pela Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul – UFMS; professor adjunto de CTBMF da Faculdade de Odontologia – FAODO/UFMS; coordenador do Programa de Residência em CTBMF do Núcleo de Hospital Universitário “Maria Aparecida Pedrossian” da UFMS. Professor do programa de pós-graduação da FAODO/UFMS.

* Rua Piratininga, 269, sala 3, Jardim dos Estados, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. CEP: 79020-240. mabenglia@yahoo.com.br

Recebido em 03/07/2014. Aceito para publicação em 10/07/2014

RESUMO

Crioterapia ou criocirurgia é uma modalidade terapêutica ou técnica cirúrgica que consiste na aplicação de substâncias criogênicas em temperaturas extremamente baixas com a finalidade de se conseguir a destruição tecidual. É uma forma de tratamento eficaz e de fácil aplicação portanto, tem sido amplamente utilizada no tratamento de lesões bucais e até mesmo em lesões em pele. Esta substância provoca uma destruição controlada e não seletiva, sendo utilizada no tratamento de diversas lesões da região orofacial. A criocirurgia apresenta diversas vantagens, tais como ausência de sangramento, baixo risco de infecção, mínimo desconforto e baixo custo. Atualmente, o nitrogênio líquido é o padrão-ouro na crioterapia. Diversas pesquisas buscam outras opções viáveis de criógenos. Pensando nisso, o presente trabalho teve como objetivo estudar e comparar os achados da literatura acerca das vantagens e desvantagens do uso da crioterapia como adjuvante no tratamento odontológico.

PALAVRAS-CHAVE: Crioterapia, nitrogênio líquido, gás refrigerante, mucosa bucal.

ABSTRACT

Cryotherapy or cryosurgery is a therapeutic modality or surgical technique that involves the application of cryogenic substances at extremely low temperatures with the purpose of obtaining tissue destruction. It is an effective treatment for easy application and therefore has been broadly used in the treatment of oral lesions and even in skin lesions. This substance causes a controlled and selective destruction not being used in

the treatment of various lesions of the orofacial region. Cryosurgery has several advantages, such as the absence of bleeding, lower risk of infection, minimal discomfort and low cost. Currently, liquid nitrogen is the gold standard in cryotherapy. Several researches seek other viable options cryogens. Thinking about it, the present work aimed to study and compare the findings in the literature about the advantages and disadvantages of the use of cryotherapy as an adjunct to dental treatment.

KEYWORDS: Cryotherapy, liquid nitrogen, refrigerant, buccal mucosa.

1. INTRODUÇÃO

Crioterapia é a aplicação de baixa temperatura capaz de modificar o meio celular envolvendo a destruição tecidual local. Esta foi primeiramente utilizada nos tecidos com objetivos anestésicos, para coibir hemorragias e no controle de edemas pós-traumas¹.

Uma das modalidades da crioterapia é a criocirurgia, na qual se utiliza temperaturas extremamente baixas para provocar uma isquemia regional, levando a um dano tecidual e, conseqüentemente, à morte celular. Uma necrose efetiva só ocorre quando o tecido é submetido a um ciclo de congelamento rápido e intenso, seguido de um descongelamento lento (aquecimento espontâneo) e, sobretudo, se este ciclo for repetido pelo menos uma vez^{2,3}.

O uso de baixas temperaturas como opção terapêutica data da antiguidade, com impressões em papiro reali-

zadas por Edwin Smith em 3.500 a.C.⁴. Desde então, diversos são os relatos de terapias pelo uso do frio.

Segundo Gage (1998)⁵, o uso do nitrogênio líquido teve seus primórdios a partir de 1950, no período Pós-Segunda Guerra Mundial, superando os já consagrados ar e oxigênio liquefeitos, em virtude do potencial explosivo deste último. A crioterapia local moderna teve início em 1959, com o neurocirurgião norte-americano Dr. Irving Cooper, para o tratamento da doença de Parkinson. Ele projetou e construiu um aparelho contendo um aplicador protegido por vácuo, exceto na extremidade. Para regular o grau de queda de temperatura, capaz de alcançar aproximadamente -196°C , fez variar a velocidade com que o nitrogênio líquido (N_2) se projetava na ponta do aplicador. Devido ao êxito obtido no tratamento dessa doença, o pesquisador resolveu estudar o efeito do congelamento extremo na periferia de tumores superficiais, observando que toda a zona congelada sofria necrose e desaparecimento das células neoplásicas. Este processo ficou conhecido como crionecrose^{6,7}.

Sua eficácia como técnica terapêutica a tornou um tratamento de rotina para a eliminação de tecidos patológicos⁸. Neste sentido, inúmeras são as patologias orofaciais que já foram tratadas pela técnica da crioterapia, tais como as leucoplasias, hiperplasias, granulomas, mucocelos, rânulas, hemangiomas, fibromas, líquen plano, queilite actínica, verruga vulgar, papilomas, estomatite nicotínica, queratoacantoma, lesões por vírus do herpes, doenças periodontais, ameloblastomas e queratocistos odontogênicos^{6,9,10,11,12,13}.

Várias substâncias podem ser usadas como agentes criogênicos. Os mais comuns são o dióxido de carbono (ponto de ebulição -79°C), o óxido nitroso (-90°C), líquido de fluorocarbono (-60°C), gás refrigerante tetrafluoretano (-47°C) e o nitrogênio líquido (-196°C), destacando-se o papel deste último que é considerado o gás ideal para criocirurgia devido às suas propriedades físicas^{2,14,15}.

Inúmeras são as vantagens e indicações desta modalidade terapêutica como a ausência de sangramento, baixa incidência de infecção secundária, relativa ausência de dor e mínimo desconforto, não forma cicatrizes, baixo custo, técnica simples, eficaz e conservadora¹.

Contraindicação ou mesmo limitação desta modalidade de tratamento, a crioterapia quando usada em tecidos moles, é a instalação do edema imediatamente após a aplicação, que predispõe ao risco de obstrução respiratória quando a crioterapia é realizada na base da língua, parede posterior da faringe e tonsilas^{16,17}, além da possibilidade de lesão de estruturas nobres¹⁸.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo é uma revisão de literatura realizada por meio da utilização de publicações disponíveis

eletronicamente no banco de dados da Biblioteca Virtual em Saúde (BVS), no período de 1967 a 2104, incluído as bases de dados LILACS, Biblioteca Virtual em Saúde (BVS), tendo sido consultadas as bases de dados *Scientific Electronic Library Online (SciELO)*. O critério de inclusão foi a relevância do estudo frente à temática abordada.

3. DESENVOLVIMENTO

A crioterapia descreve em sentido amplo, o uso frio com modalidade terapêutica, sendo a criocirurgia, ou também denominada de crioablação, uma forma de crioterapia, que se utiliza de baixas temperaturas para provocar uma destruição celular em um tecido vivo de forma localizada, ou seja, *in situ*^{14,4}.

Denomina-se criolesão o efeito localizado do congelamento no tecido¹⁹. A lesão criogênica é caracterizada por uma necrose circunscrita que corresponde ao volume de tecido previamente congelado². Os criógenos, agentes criogênicos ou agentes crioterápicos são gases capazes de atingir baixas temperaturas, sendo utilizados com finalidades terapêuticas, para a destruição de tecidos, ou como agentes congelantes, para conservação de substâncias biológicas ou alimentares¹⁴.

Histórico

O Dr. James Arnott foi o primeiro a relatar o uso de baixas temperaturas como opção terapêutica para lesões malignas, usando uma mistura de gelo e sal, visando à necrose tecidual de um neoplasma de mama^{5,4,20}.

No século XIX, cientistas observaram que gases atmosféricos, quando comprimidos, aqueciam e se tornavam líquidos. Quando estes fluidos eram liberados, expandiam-se e resfriavam-se. Usando este princípio, o oxigênio foi o primeiro ar a ser liquefeito, e, posteriormente, todos os gases “permanentes”, como o oxigênio, o nitrogênio e o hidrogênio, puderam ser liquefeitos⁵.

A primeira aplicação clínica de gases liquefeitos para uso médico foi relatada por A. Campbell White em 1889, Nova York. Este pesquisador utilizou o gás refrigerado no tratamento de diversas doenças de pele, que incluíam herpes zoster, cancro mole, nevos, lúpus eritematoso sistêmico, úlceras varicosas de pernas e epitelomas. Logo em seguida, em 1892, James Dewar desenvolveu um recipiente a vácuo, no qual os gases liquefeitos podiam ser armazenados, estabelecendo, assim, o comércio dos gases e o termo agente criogênico passou a ser utilizado⁵.

O melhoramento das técnicas de congelamento só foi possível em 1907, quando William Pusey popularizou o uso do dióxido de carbono - CO_2 - (gelo seco) como agente criogênico no tratamento de hemangiomas de queloides. Afirmando então que este produto poderia

atingir temperaturas mais baixas^{4,5,21}.

Após a segunda Guerra Mundial, o nitrogênio líquido tornou-se comercialmente disponível, e por ser mais seguro e atingir temperaturas mais baixas como -196°C , este gás, gradualmente, ganhou a preferência nos tratamentos cirúrgicos⁵.

O desenvolvimento da criocirurgia como técnica terapêutica recebeu maior estímulo após o aparecimento de uma aparelhagem própria, que permitia o congelamento *in situ* com o nitrogênio líquido de forma mais prática, utilizando pontas de aplicação e comandos de controle para regulação da temperatura desejada. Assim, além dos dermatologistas, esta técnica passou a ser apreciada pelos neurocirurgiões, ginecologistas, ortopedistas, urologistas, oftalmologistas, cardiologistas e oncologistas^{5,22}.

Em Odontologia, encontram-se relatos do uso da criocirurgia desde a década de 1960, sendo ela utilizada para tratamento de lesões intraósseas e lesões de mucosa oral⁹. Esta terapêutica foi bem difundida nas décadas de 70 e 80^{5,9}.

Já na década de 90, o avanço de modelos matemáticos e o desenvolvimento de técnicas de imagem, como a ultrassonografia, tomografias computadorizadas e ressonância magnética, propiciaram o “renascimento” e novas indicações para aplicação do frio em medicina²³.

A maioria das pesquisas, até o momento, utilizou o nitrogênio líquido como principal agente crioterápico no tratamento das lesões da cavidade oral, sendo considerado o padrão-ouro nesta modalidade de tratamento^{7,24,25}. O custo do nitrogênio líquido é relativamente baixo, porém o custo da aparelhagem (contêiner próprio, criocautério com válvula, ponteiros abertos e fechados, entre outros) para criocirurgia ainda é considerado elevado para o padrão de muitos consultórios e hospitais⁷. Além disso, este criógeno tem uma vida útil curta devido à sua evaporação rápida e contínua, mesmo quando armazenado em recipientes fechados, dificultando seu armazenamento por longos períodos²⁶ (KUMAR *et al.*, 2012).

O gás refrigerante tetrafluoretano atinge a temperatura -47°C , apresenta de ponto de fusão de -101°C e ponto de ebulição -20°C ^{15,27}. No Brasil é comercializado pela DremaFreeze[®]. Este gás é incolor, não produz resíduo e apresenta segurança clínica comprovada, sendo utilizado na dermatologia e na veterinária, para tratamento de lesões benignas de pele, e na odontologia apenas para realização dos testes de vitalidade pulpar^{15,27}.

Atualmente, alguns pesquisadores começaram a utilizar os gases refrigerantes no tratamento criocirúrgico das pigmentações melânicas da gengiva^{26,27,28}; e como parte do tratamento de tumores benignos da cavidade oral¹³.

O gás refrigerante propano-butano (Endo-Frost[®], Roeko, Langenau, Alemanha) é amplamente utilizado na odontologia para se realizar os testes de vitalidade pulpar. Este gás é inodoro, atóxico, inflamável quando exposto ao calor, não produz CFC e atinge a temperatura de -50°C , sendo geralmente aplicado na coroa dentária para o teste de resposta ao frio da polpa dentária¹⁵. Entretanto, não existem pesquisas publicadas, até o momento, utilizando este gás refrigerante na mucosa oral ou em qualquer lesão de pele ou mucosa para provocar criolesão.

Segundo Bansal *et al.* (2012)⁷, os sistemas disponíveis para uso da criocirurgia podem ser classificados em abertos ou fechados. Os sistemas abertos caracterizam-se pela aplicação direta do agente crioterápico na lesão com hastes de algodão ou por *spray*. As hastes de algodão podem ser confeccionadas de acordo com o tamanho da lesão. E as ponteiros para o *spray* apresentam orifícios centrais com diversos diâmetros.

Estes sistemas são aplicáveis a lesões proliferativas espessas e invasivas, cujo controle da profundidade de destruição é de importância secundária, bem como no tratamento de lesões ósseas. Os sistemas fechados oferecem um maior grau de controle, sendo a profundidade do congelamento menos profunda do que com os sistemas abertos^{7,10}.

Os sistemas fechados podem produzir temperaturas frias através de três tipos diferentes de fenômenos físicos, segundo Leopard (1975)¹⁰: a Evaporação, mudança de um sólido ou líquido para um gás provocando a queda da temperatura; o efeito Peltier ou efeito termoelétrico, no qual as baixas temperaturas são obtidas pela passagem de uma corrente elétrica que atravessa junções metálicas diferentes; e o efeito Joule-Thomson ou expansão gasosa adiabática, pelo escape de um gás mantido em alta pressão que produz a queda de temperatura.

Efeitos da Crioterapia

A crionecrose é a lesão celular direta, que ocorre em resposta à exposição à temperatura negativa extrema^{6,7}.

A natureza da resposta dos tecidos à crioterapia depende da gravidade da lesão causada pelo frio. Um congelamento lento e de menor intensidade pode provocar apenas uma resposta inflamatória, mas o congelamento rápido e intenso mata as células e resulta em destruição dos tecidos^{3,5}. Entretanto, experiências *in vivo* demonstraram que a taxa de resfriamento, se lenta ou rápida, não seria tão importante quanto os outros fatores envolvidos no ciclo congelamento/descongelamento³.

Efeitos diretos do congelamento segundo Leopard (1975)⁴ são: o rompimento celular, quando a taxa de congelamento é rápida (maior que 5°C/s) e acontece

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

A desnaturação das proteínas ocorre pela exposição ao frio intenso. As membranas celulares têm ligações instáveis e sensíveis ao congelamento. A perda de fosfolípidios aumenta a permeabilidade da membrana celular, levando a célula ao aumento de volume e posterior lise. Este processo pode ocorrer tanto durante o congelamento quanto no descongelamento^{2,7}. Como cada enzima celular opera em uma temperatura regular média, o congelamento repentino age como inibidor, modificando o metabolismo celular, deixando a célula vulnerável a sofrer danos⁴. Todas as membranas de uma célula, como as das mitocôndrias, microsomas e núcleo, sofrem danos pelo congelamento, devido à desnaturação dos complexos lipoproteicos²⁹.

Segundo Gage *et al.* (2009)³, a pedra angular da lesão celular direta por congelamento é a formação de cristais de gelo, que removem a água das células e leva a uma sequência de eventos deletérios. Investigações recentes *in vitro* e *in vivo* identificaram a apoptose, ou morte celular geneticamente regulada, como um mecanismo de lesão direta. As células da porção central da lesão sofrem necrose pela ação criogênica e as células da porção periférica sofrem apoptose, que em geral ocorre de 8 a 12 horas após o congelamento. Ainda de acordo com os autores, a apoptose ocorre ao redor da área necrótica, mas a fronteira entre estes dois eventos não está bem definida³⁰.

Outro evento envolvido é o choque térmico, que se refere à lesão celular causada pela mudança brusca de temperatura, que ocorre independentemente dos outros efeitos diretos do congelamento. O choque térmico acontece pela variação de capacidade de expansão das

membranas dos vários componentes celulares, que se rompem durante essa mudança de temperatura^{7,29}.

Efeitos Indiretos do congelamento são os efeitos vasculares, que ocorrem entre 1 e 2 horas após a criocirurgia, o fluxo sanguíneo é reduzido e este dano é intensificado nas próximas 24 horas^{2,3,4}. A principal alteração que ocorre nessa fase é a aglutinação, tamponamento e aderência de células vermelhas entre si e à parede do vaso²⁹. O resultado dessa estase vascular leva à trombose e à isquemia, seguidas de hipóxia ou até mesmo anóxia, mudança de pH e morte celular^{4,29,30}. Logo, o efeito do congelamento sobre os vasos é claramente importante e, talvez, o fator determinante na morte celular³.

A anóxia celular consequente da perda de circulação é considerada o principal mecanismo de lesão na criocirurgia²⁹. Após o descongelamento dos tecidos, a estase microcirculatória se desenvolve rapidamente. A resposta inicial à refrigeração do tecido é a vasoconstrição, redução e até interrupção do fluxo, quando o congelamento é completo^{2,29}.

A taxa de congelamento, para ser mais letal às células, deve ser alta, isto é, um congelamento rápido³. O que implica baixas temperaturas em curto espaço de tempo^{4,31,32}, pois promove maior quantidade de cristais intracelulares^{3,7,20}.

Quando o congelamento ocorre rapidamente, a célula não é capaz de perder água para o meio externo para manter o equilíbrio, formando-se então, uniformemente, cristais de gelo intra e extracelulares^{2,3,7,31}. Os cristais intracelulares podem provocar destruição mecânica da membrana celular ou das organelas, como resultado de seus coeficientes de distensão térmica^{9,20,32}. O dano físico é imediato³³, sendo mais destrutivo do que o congelamento lento, pois promove a formação de gelo intra e extracelular, com efeitos diretos em todos os substratos celulares^{4,7,31}.

Quando o processo de congelamento é lento, ocorre, primeiramente, a formação de cristais no meio extracelular (EMMINGS *et al.*, 1967; HAUSAMEN, 1975; LEOPARD, 1975; TAL, 1982; POGREL, 1993), onde são menos letais, mas provocam desequilíbrio osmótico (GAGE; BAUST, 1998). À medida que os cristais aumentam de tamanho, ocorre a absorção da água extracelular, que, então, não mais poderá ser utilizada como solvente para as células. Há um aumento da concentração iônica extracelular que, conseqüentemente, provoca a saída de água do interior da célula, devido à diferença de osmolaridade. Esta perda de água pela célula eleva a quantidade de eletrólitos no seu interior, deixando-os em níveis tóxicos e letais^{2,9,18,31,32,33}.

Um fator que também contribui para a destruição celular é a taxa de reaquecimento do tecido após ter sido congelado³. Isto é, o tempo que o tecido leva para

descongelar e se reaquecer^{7,31,32}.

Os eletrólitos, que aumentaram de concentração no interior da célula, no processo de reaquecimento celular promovem uma entrada de água, resultando em edema e ruptura celular^{4,7,33}. Com o reaquecimento e o descongelamento lento dos tecidos, promove-se um meio líquido, que é importante para que ocorram as reações de desnaturação das proteínas^{7,32}. Os cristais de gelo formados em temperaturas muito baixas são de pequeno tamanho e crescem como resultado de sua recristalização que ocorre no período de reaquecimento. Tornando-se de maior tamanho, os cristais causam ruptura das organelas e membranas, levando à morte celular^{29,31}. Estes acontecimentos explicam o fato do reaquecimento tecidual, no processo de destruição celular, ser tão importante quanto o congelamento^{4,9}. O processo de recristalização e as reações de desnaturação proteica dependem de um período de reaquecimento prolongado^{7,31}. Caso o descongelamento ocorra rapidamente, os pequenos cristais irão apenas derreter, logo não haverá dano mecânico à célula. Portanto, pode-se dizer que o descongelamento lento causa maior dano celular que o descongelamento rápido^{3,4,7,9,29}.

A repetição de ciclos produz mais destruição tecidual, pois as células são submetidas às adicionais mudanças deletérias ao passar novamente por condições térmicas danosas. Em cada ciclo sucessivo, o resfriamento tecidual é mais rápido e o volume de tecido congelado é maior. A ruptura dos elementos celulares e membranas, no primeiro ciclo de congelamento/aquecimento, pode ser o responsável por um evidente aumento na condutividade térmica tecidual no segundo ciclo. Desta forma, ciclos sucessivos aumentam a necrose tecidual resultante^{2,7,9}.

Técnicas

Leopard & Poswillo (1974)³³ descreveram técnicas de aplicação da crioterapia em lesões bucais benignas com a utilização de agulhas termométricas, tendo como objetivo medir a temperatura no local e ter previsão da área necrosada. Todavia, a técnica preconizava o posicionamento das agulhas ao redor de toda a bola de gelo, conectada a vários medidores, o que tornava a técnica difícil. Não houve necessidade de anestesia para a grande maioria dos casos. Para melhorar a condutividade térmica, as lesões foram impregnadas com um gel solúvel em água. De acordo com os autores, a sonda deveria ser aplicada firmemente na superfície da lesão. Para a maioria das lesões benignas, dois ciclos de 2 minutos de congelamento, intercalados por um período de reaquecimento espontâneo, foram quase sempre suficientes para destruir a área desejada. Porém três ou mais ciclos seriam necessários para lesões malignas. Em lesões hiperplásicas, com grande aumento tecidual, o tempo de congelamento também deveria ser maior que 2

minutos. Nos hemangiomas capilares da face os melhores resultados foram alcançados com pequenos ciclos de 10 segundos, pois, os ciclos de 20 segundos provocavam necrose superficial da pele. Nas leucoplasias deveriam ser utilizados dois ciclos de dois minutos de congelamento.

Marciani & Trodahl (1975)³⁴ relataram a possibilidade de ocorrer sequelas estéticas e funcionais, exposição de osso alveolar, fratura patológica, linfadenopatia persistente e osteorradionecrose, em áreas previamente irradiadas com o uso da criocirurgia. O atraso na cicatrização e a presença de cicatrizes extensas foram ocorrências comuns no estudo. Pode ocorrer uma cicatrização fibrosa na região vestibulo bucal, alterando a extensão da abertura bucal, e conseqüentemente, dificultando a fala. Quando esta cicatrização ocorre na língua e na faringe, pode prejudicar a fala e a deglutição. A exposição do osso mandibular lingual pode interferir com a substituição da prótese total inferior. A presença de linfadenopatia persistente pode ser um fator complicador em pacientes tratados de câncer oral, pela alteração dos linfonodos cervicais. Por estas razões, os autores não aconselham o congelamento de lesões benignas que podem ser removidas com excisão cirúrgica, seguido de sutura e cicatrização por primeira intenção.

Tal (1992)³⁵ tratou seis casos de hemangioma em lábio com criocirurgia por óxido nítrico (-81°C), utilizando uma sonda proporcional ao tamanho da lesão. Estas variavam de 4 a 9 mm e situavam-se no vermelhão do lábio superior e inferior. Foram utilizados dois ciclos de congelamento de 40 segundos, com tempo de reaquecimento de 1 minuto entre ambos. Não foi necessário o uso de anestesia durante o procedimento. Após 1 hora da criocirurgia os pacientes apresentaram eritema e edema no local. O tecido necrótico que surgiu nos primeiros 7 dias esfoliou entre duas e quatro semanas, sendo totalmente epitelizada. A cicatrização ocorreu sem intercorrências, não deixando cicatriz. O completo desaparecimento da lesão ocorreu em 4 casos. Duas lesões maiores apenas reduziram em tamanho e não receberam tratamento adicional.

Turjansky e Stolar (1992)¹⁴ trataram 158 casos de diferentes patologias na cavidade bucal com criocirurgia. Foi utilizado o nitrogênio líquido para o tratamento de doze angiomas, três linfangiomas, seis granulomas piogênicos, uma mucocele, vinte lesões por HPV, dezesseis queilites, vinte leucoplasias, onze líquens plano, uma estomatite nicotínica, três hiperplasias papilares, dezenove carcinomas *in situ*, duas eritroplasias, vinte e três papilomas, vinte e um carcinomas espinocelulares, utilizando diversos protocolos de aplicação do agente criogênico. O método variava de acordo com o tipo, tamanho e profundidade da lesão. Para os angiomas e linfangiomas realizou-se o

congelamento com sonda por 2 a 3 minutos. Para os granulomas utilizou-se o *spray* por 20 a 30 segundos. Em mucocelos utilizou-se a sonda por 15 a 20 segundos. Nas lesões por HPV utilizou-se o *spray* por 20 segundos. As queilites e leucoplasias foram tratadas com *spray* por 1 a 3 minutos. Para os líquens utilizou-se *spray* por 20 a 30 segundos. Em hiperplasia papilar, os autores realizaram exérese da lesão e congelaram a base com o uso do *spray* por 30 segundos. Nos casos de carcinomas *in situ*, intercalou-se sonda e *spray*, de forma a abranger toda a lesão, com tempo de congelamento sempre maior que 1 minuto. Para as eritroplasias utilizou-se o *spray* com três ciclos de 90 segundos cada. Para os papilomas o tempo variou de 120 a 180 segundos, utilizando o *spray*. Em algumas lesões malignas foi utilizada a radiocirurgia ou a cirurgia convencional para remoção da parte vegetante e logo em seguida foi congelada a base destas lesões. Os autores chegaram à conclusão que a criocirurgia sozinha ou conjugada com a cirurgia convencional ou radiofrequência permite a extirpação de lesões benignas e malignas sem perda de substância. Isso significa preservar estruturas anatômicas. Outra vantagem foi que não houve dano ao tecido ósseo ou aos dentes próximos ao local operado. Neste estudo, a criocirurgia demonstrou ser um método valioso para tratamento de diversos tipos de lesão da cavidade bucal, sejam estas benignas ou malignas.

O tratamento de cistos de retenção mucoso, em lábio e base de língua, foi relatado por Toida *et al.* em 1993³⁶. Dezoito pacientes foram tratados com aplicação direta de nitrogênio líquido com haste de algodão sobre as lesões. Estas variavam de 2 a 7 mm de diâmetro. O nitrogênio líquido foi armazenado em garrafa térmica. O tamanho das hastes foi escolhido de acordo com o tamanho de cada lesão. Foram utilizados de 4 a 5 ciclos de 10 a 30 segundos de congelamento, seguidos por um período de reaquecimento de duas vezes maior que o de congelamento. Não foi necessário o uso de anestesia. Não houve dor pós-operatória, hemorragia, infecção ou formação de cicatriz. Uma desvantagem da técnica foi que algumas partes do tecido não sofreram uma necrose adequada, sendo necessário repetir algumas aplicações. Os autores afirmaram que a utilização das hastes de algodão foi vantajosa, pois apresentou baixos custos, boa aceitação do paciente e fácil adaptação ao tamanho da lesão, quando comparado às sondas.

Marcushamer *et al.* (1997)³⁷ relataram o uso da criocirurgia, com o nitrogênio líquido aplicado com algodão, para o tratamento de mucocelo em crianças. Cada lesão foi exposta de 8 a 10 aplicações consecutivas, com duração de 5 a 10 segundos, até que toda a lesão estivesse congelada. Após uma semana houve diminuição do tamanho das mucocelos e uma nova aplicação foi realizada, ocorrendo o desaparecimento das lesões em 1 semana. Não houve dor pós-operatória, sangramento ou infecção.

De acordo com os autores, a criocirurgia foi uma ótima opção de tratamento para as mucocelos, principalmente em crianças, pois estas toleraram bem a técnica.

Ishida e Ramos-e-Silva (1998)¹⁶ fizeram uso a criocirurgia tanto pela técnica do *spray* como pela sonda, para diversas lesões de boca, tais como: granuloma piogênico, angioma, queilite actínica, ceratoacantoma, fibroma, lesões por HPV em pacientes imunodeprimidos ou não, líquen plano hipertrófico, leucoplasia e eritroplasia, carcinoma verrucoso, cisto mucoso e hiperplasia do palato, e relataram bons resultados. Dois ou três ciclos foram necessários. A criocirurgia foi considerada um procedimento seguro e de baixo custo. Corticoides poderiam ser administrados, por via oral ou intramuscular, antes da realização da criocirurgia para reduzir o edema, principalmente quando se realizam procedimentos em língua, assoalho bucal e região posterior da boca.

Lemos-Júnior (1999)³⁸ utilizou a criocirurgia em 37 pacientes para tratamento de lesões bucais como: hemangiomas, mucocelos, rânulas, hiperplasias fibrosa inflamatória, papilomas, leucoplasias e líquens plano. Conforme o tipo, tamanho e forma da lesão selecionou-se a técnica de tratamento, sendo o *spray* empregado em lesões extensas e mal delimitadas, maiores que 2 cm e a sonda empregada em lesões menores, de até 2 cm. Em alguns casos, alternou-se entre um método e outro, segundo julgamento clínico. A aplicação variou de uma única sessão até três sessões distintas, com intervalos de 2 semanas. Em cada sessão utilizou-se dois a três ciclos de aplicação, procurando-se congelar toda a lesão, com um tempo mínimo de 20 segundos e um tempo máximo de 40 segundos. O resultado do tratamento com criocirurgia variou conforme o tipo de lesão. O autor ressaltou que as leucoplasias poderiam ser tratadas por este método, porém, a chance de recidiva seria alta e os resultados imprevisíveis.

Santos, em 2002³⁹, testou diferentes protocolos de aplicação de nitrogênio líquido em mucosa dorsal da língua de ratos. Foram realizadas duas aplicações de 20 segundos, com intervalo de 5 minutos entre elas, usando os sistemas fechado (sonda) e aberto (*spray* e haste de algodão). Os animais foram sacrificados seis horas após a criocirurgia e as amostras puderam ser analisadas histologicamente. Após o experimento, os autores concluíram que a aplicação do agente criogênico em *spray* não deveria ser utilizada na cavidade bucal por falta de previsibilidade na extensão do dano, além disso, provocou edema pronunciado e de difícil controle. A técnica por sonda foi mais segura, pois apresentou menor extensão do dano causado e provocou menor edema. Os autores não recomendam o uso da crioterapia na região posterior da cavidade bucal. A aplicação do nitrogênio líquido com haste de algodão foram mais

brandas, sem alteração da forma anatômica da língua e com dano tecidual limitado ao local de aplicação. Porém o grande número de aplicações, às quais, muitas vezes, o paciente deve ser submetido pode não trazer vantagens em relação a outros tipos de terapia.

Silva (2003)⁴⁰ realizou um estudo em coelhos, utilizando 15 animais, em cujas mandíbulas direitas foram confeccionados defeitos ósseos, que foram protegidos com gazes ao redor. Posteriormente foram submetidos à aplicação de nitrogênio líquido em dois ciclos de 10 segundos cada, com intervalo de 2,5 minutos, enquanto os defeitos contralaterais serviam como controle. Os animais foram sacrificados em 2, 15 e 60 dias de pós-operatório para avaliação. Concluiu que o congelamento não ocorreu de forma homogênea e, que a aplicação de nitrogênio líquido não interferiu com a cronologia e processo de regeneração do tecido ósseo, mostrando-se efetivo quanto à necrose das paredes ósseas. Observou ainda que a penetração do congelamento, em relação às paredes ósseas do defeito cirúrgico foi de aproximadamente 2,5 mm.

Prasad *et al.* (2009)²⁴ realizaram um estudo clínico retrospectivo de leucoplasias e mucocelos tratadas com nitrogênio líquido. Quarenta pacientes foram selecionados para o estudo. Vinte pacientes com leucoplasia e vinte com mucocelo. Os autores descreveram uma técnica simples e econômica de crioterapia, utilizando copos descartáveis de plástico, hastes de algodão e nitrogênio líquido. Foi utilizado anestésico tópico em gel para minimizar o desconforto. Os tecidos vizinhos foram protegidos com gaze para evitar traumas desnecessários. A técnica consistia em mergulhar a haste de algodão no nitrogênio líquido de 1-2 segundos, aplicando-o sobre a lesão, com pequena pressão, durante 10 a 30 segundos por ciclo, seguido por um período de descongelamento com o dobro do tempo de congelamento. Segundo os autores, o tempo de congelamento/descongelamento depende do volume e profundidade da lesão, bem como da experiência do cirurgião. Todo grupo com mucocelo foi curado sem qualquer complicação ou recorrência, mas cinco pacientes com leucoplasia apresentaram recidiva. A causa deste insucesso foi atribuída aos hábitos do paciente. Concluíram que a técnica descrita de crioterapia é promissora e tem bons resultados, apresentando vantagens sobre as técnicas convencionais de tratamento.

Mendonça *et al.* (2011)¹³ relataram um caso clínico de um paciente do gênero masculino, de 39 anos de idade, que foi acometido por um ameloblastoma em maxila esquerda com invasão do seio maxilar. O tratamento instituído foi a hemimaxilectomia esquerda associada à crioterapia com gás refrigerante tetrafluoretano em *spray*, com intuito de preservar a fibromucosa palatina e diminuir a recidiva e/ou as sequelas da remoção cirúrgica do tumor. A crioterapia

foi realizada com gás refrigerante (tetrafluoretano) à -50°C, por meio de três aplicações de 10 segundos cada, com intervalo de cinco minutos para reaquecimento dos tecidos. A fibromucosa palatina pôde ser preservada. Esta cicatrizou bem e sem a presença de fistulas ou fibrose excessiva. A mucosa apresentou-se íntegra e normocorada no acompanhamento de 18 meses de pós-operatório. No período de acompanhamento, o paciente encontrava-se bem e satisfeito com o resultado estético-funcional. A tomografia computadorizada de controle demonstrou não haver indícios de recidiva da lesão.

Análise Histológica

Hurt *et al.* (1972)⁴¹, após aplicação de nitrogênio líquido em hiperplasia gengival crônica, relataram a formação de bolha subepitelial e hiperemia no tecido conjuntivo, no pós-operatório imediato. Após três a quatro dias houve intenso infiltrado inflamatório.

Buch *et al.* (1979)⁴² estudaram, histologicamente, as alterações provocadas pelo congelamento e observaram que logo após a aplicação do agente criogênico havia a formação de uma vesícula subepitelial, sem a formação de hemorragias. As arteríolas e vênulas apresentavam trombose com degeneração da musculatura de suas paredes. Após seis horas da realização do procedimento, observou-se dano epitelial. Em 24 horas, verificou-se o aparecimento abundante de leucócitos e neutrófilos. No quarto dia de pós-operatório a necrose havia se estendido e a destruição dos vasos sanguíneos era evidente. Ao sexto dia a revascularização estava completa, completando a cicatrização com 14 dias.

Whittaker (1980)⁴³ estudou as primeiras alterações celulares, após a criocirurgia, em mucosa de ratos, dando ênfase às células do epitélio basal e às células gigantes. Verificou, nos primeiros 30 a 40 minutos, um aumento da atividade mitótica nas células do epitélio basal, sugerindo que a criocirurgia estimularia a divisão celular.

Em Whittaker (1984)⁴⁴ estudou as alterações celulares que ocorrem a -70°C, após aplicação de nitrogênio líquido, por 1 minuto, em língua de ratos. Os animais foram mortos após o procedimento e em diferentes tempos pós-operatórios. Progressivas alterações nos constituintes citoplasmáticos, na estrutura da parede da membrana celular, na lâmina densa e no núcleo foram aparentes após o reaquecimento celular. Houve dilatação de algumas seções do retículo endoplasmático, mas a distribuição dos ribossomos, a estrutura dos tonofilamentos e desmossomos e a espessura dos espaços intercelulares aparentavam-se normais. Dois minutos após o congelamento, foram vistas pequenas vesículas intracitoplasmáticas, intercaladas por uma membrana dupla. Largos vacúolos estavam presentes e se apresentavam em continuidade com o espaço extracelular, o que causava compressão nuclear. Os espaços intercelulares das células

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

Valente (2014)⁴⁵ avaliou histologicamente a cicatrização de lesões cutâneas provocadas pelo *spray* de nitrogênio líquido em 40 ratos Wistar, associada ou não com terapia tópica. Macroscopicamente, a cada dois dias, analisaram-se as medidas das lesões e calculou-se a área e a taxa de contração cicatricial das mesmas. No 28º dia pós-operatório, procedeu-se à coleta das biópsias para avaliação histopatológica e imuno-histoquímica, quanto à presença de células inflamatórias, intensidade de deposição de colágeno, densidade de mastócitos, proliferação epitelial e angiogênese. Com base nos resultados obtidos, concluiu-se que não se observa diferenças estatísticas significativas entre os grupos pesquisados quanto à proliferação epitelial, neovascularização e deposição de colágeno, nas avaliações histopatológicas e imuno-histoquímicas aos 28 dias de pós-operatório. O autor sugeriu a realização de novos estudos com cicatrização de lesões causadas pela criocirurgia, no que diz respeito às ferramentas que podem ser usadas com o intuito de acelerar esse processo e melhorar a qualidade das cicatrizes. Propôs ainda, a realização de biópsias e análises histopatológicas em períodos de tempo menores que 28 dias, com a finalidade de detectar e compreender diferenças em todas as fases do processo de reparo de feridas causadas pelo nitrogênio líquido (queimaduras frias), desde a promoção da crionecrose até sua queda e formação da cicatriz.

4. DISCUSSÃO

Em comparação a outras técnicas de tratamento, a criocirurgia é uma técnica muito segura, de fácil execução, eficaz, conservadora e relativamente barata para o tratamento ambulatorial de várias lesões benignas da cavidade oral com diminuição ou ausência de sangramentos no trans e pós-operatórios, ser um método relativamente indolor, não necessitando de anestesia, e poder ser realizada em pacientes de risco ou com patologias sistêmicas que dificultariam o procedimento cirúrgico^{4,9,16,22,32,46}.

Demonstra ser uma terapia com uma grande gama de indicações, sobretudo no tratamento de lesões bucais com altos índices de sucesso, seja malformações arteriovenosas, leucoplásicas e até lesões virais, como verrugas vulgares e papiloma bucal^{16,47}.

Do ponto de vista da estética do sorriso, há relatos do uso da crioterapia para o tratamento de pigmentações na linha do sorriso, com resultados promissores^{26,27,28,35}, fato corroborado pela simplicidade da técnica sendo também utilizada no tratamento de hiperplasias papilares^{9,14} ou leucoplasias^{9,24,48}.

Os resultados cosméticos após a aplicação da criocirurgia são excelentes^{1,22}. O tratamento pode ser repetido quantas vezes forem necessárias sem formar cicatrizes fibrosas, o que é importante em área cosmética da face e em sulcos anatômicos¹. A regeneração tecidual, sem a formação de cicatriz, oferece uma grande vantagem quando comparada a excisão cirúrgica^{8,35,49}.

Em tumores mistos intraósseos, com alto grau de recidiva, onde a ressecção com margem de segurança é indicada, a criocirurgia tem sido uma boa opção, pois o efeito letal do congelamento penetra no periósteo e osso adjacente, sede de prováveis células tumorais, produzindo a desvitalização e impedindo a recidiva e, desta forma, a ressecção óssea extensa pode ser evitada^{1,9,13,18,50,51}.

Em contrapartida, a criocirurgia não apresenta um efeito destrutivo padronizado, já que alguns tecidos apresentam maior resistência do que outros⁴. A dificuldade em julgar a extensão da lesão produzida pode resultar em destruição ineficaz de tecido patológico, pois a lesão pode ser maior que a capacidade de congelamento do instrumental, sendo necessária a realização de várias aplicações⁵².

O edema pronunciado além da extensão da área de necrose configuram-se como as principais desvantagens do uso da crioterapia^{18,50}. A cicatriz normalmente não é fibrosa, porém a fibrose pode ocorrer em tratamento de lesões muito extensas¹ sendo que em muitas vezes o período de cicatrização é longo^{34,52}.

Autores demonstraram um amplo período de cicatrização. O processo de cicatrização em seis semanas foi citado⁹. Diferentemente, a re-epitelização em 7 a 10 dias na boca e 10 a 20 na pele foi encontrada. A re-epitelização das feridas cirúrgicas ocorre em 10 dias a 7 semanas, o que dependerá do tamanho da área tratada⁵³.

A literatura mostra que nem todos os pacientes podem receber a criocirurgia. Geralmente as contra-indicações são raras e podem ser divididas em absolutas, gerais e relativas^{16,17}. Segundo os mesmos autores, as contra-indicações absolutas são: urticária ao frio, intolerância ao frio, criofibrinogenemia, crioglobulinemia, doença de Raynaud, doenças autoimunes, pioderma gangrenoso, agamaglobulinemia e diabetes descompensado.

As contraindicações gerais são: tumores sem margens bem definidas, lesões localizadas no ângulo da boca ou na borda do lábio, neoplasias localizadas em área de fusão dos tecidos embrionários, lesão na margem livre das pálpebras, carcinoma espinocelular infiltrante ou ulcerado, melanoma cutâneo, tumores anexiais, tumor de célula de Merkel e falta de habilidade do operador. As contraindicações relativas são: lesão sobre localização superficial de nervos (margem lateral dos dedos, fossa ulnar, região pré e pós-auricular e área lateral da língua), terço inferior da perna e parte inferior do ombro (devido à cicatrização prolongada) e paciente melanoderma (devido à alteração pigmentar).

Outros autores citam ainda como contraindicações à criocirurgia o suprimento vascular prejudicado, mieloma múltiplo e discrasia sanguínea. E que se deve ter cautela no uso da técnica nos pacientes que fazem uso de anticoagulantes, alérgicos, pessoas de pele escura, crianças, idosos, em pele danificada pelo sol ou irradiada e em locais de proeminência óssea²².

5. CONCLUSÃO

Como demonstrado por Schmidt *et al.* (2001)¹² a crioterapia possui a capacidade de desvitalizar o osso *in situ* e manter a estrutura inorgânica intacta, o que leva a utilização dessa terapia para lesões localmente agressivas dos maxilares, incluindo o queratocisto odontogênico, ameloblastoma e fibroma cemento-ossificante.

REFERÊNCIAS

- [1] Santos AMB, Sant'ana-Filho M. Análise morfológica do efeito de diferentes protocolos de nitrogênio líquido sobre a mucosa bucal: estudo em ratos. *Rev Fac Odontol.* 2002; 43(2):18-23.
- [2] Gage AA, Baust J. Mechanisms of tissue injury in cryosurgery. *Cryobiology.* 1998; 37:171-86.
- [3] Gage AA, Baust JM, Baust JG. Experimental Cryosurgery Investigations In Vivo Cryobiology. 2009; 59(3):229-43.
- [4] Leopard, P. J. Cryosurgery, and its application to oral surgery. *Brit. J. oral Surg.*, v. 13, n. 2, p. 128-52, nov., 1975.
- [5] Gage AA. History of cryosurgery. *Semin Surg Oncol.* 1998;14(2):99-109.
- [6] Costa FWG, Soares ECS, Batista SHB. Criocirurgia no tratamento de lesões benignas dos maxilares: revisão de literatura e análise de 103 casos previamente Reportados. *Rev Sul-Bras Odontol.* 2010;7(2):208-15.
- [7] Bansal A, Jain S, Gupta S. Cryosurgery in the treatment of oro-facial lesions. *Indian J Dent Res.* 2012; 23(2):297-302.
- [8] Yeh CJ. Simple cryosurgical treatment for oral lesions. *Int. J. oral maxillofac. Surg.* 2000; 29(3):212-6.
- [9] Emmings FG, Koepf SW, Gage AA. Cryotherapy for benign lesions of the oral cavity. *J Oral Surgery.* 1967; 25(4):320-6.
- [10] Leopard PJ. Cryosurgery and its application to oral surgery. *Br J Oral Surg.* 1975; 13(2):128-52.
- [11] Thai KE, Sinclair RD. Cryosurgery of benign skin lesions. *Aust. J. dermatol.*, 1999; 40(4):175-84.
- [12] Schmidt BL, Pogrel MA. The use of enucleation and liquid nitrogen cryotherapy in the management of odontogenic keratocysts. *J Oral Maxillofac Surg.* 2001;59(7):720-5.
- [13] Mendonça JCG, Santos AA, Lopes HB. Hemimaxilectomia associada à crioterapia no tratamento de ameloblastoma: relato de caso. *Rev Bras Cir Craniomaxilofac.* 2011; 14(1):63-6.
- [14] Turjansky E, Stolar E. Criocirurgia en lesiones de boca. *Rev Asoc Med Argent.* 1992; 105(5):22-6.
- [15] Moura-Netto C, Yamazaki AK, Cardoso LN, Cabrales RJS, Prokopowitsch. Avaliação da temperatura mínima alcançada por cinco gases refrigerantes. *Rev Inst Ciênc Saúde.* 2007; 25(4):403-5.
- [16] ISHIDA CE, RAMOS-SILVA M. Cryosurgery in oral lesions. *Int J dermatol.* 1998; 37(4):283-5.
- [17] Ishida CE. Criocirurgia. In: Kadunc B, Palermo E, Addorf F, Metsavaht L, Rabello L, Mattos R, Martins S. *Tratado de cirurgia dermatológica, cosmiaatria e laser: da Sociedade Brasileira de Dermatologia.* Rio de Janeiro: Elsevier; 2013; 537-54.
- [18] Pogrel MA. The use of liquid nitrogen cryotherapy in management of locally aggressive bone lesion. *J Oral Maxillofac Surg.* 1993; 51(3):269-73.
- [19] Barnard D. The effects of extreme cold on sensory nerves. *Annals of the Royal College of Surgeons of England.* 1980; 62(3):180-7.
- [20] Whittaker, DK. History of Cryosurgery. In: Bradley PF. *Cryosurgery of the Maxillofacial Region.* CRC Press.1986; 1:1-15.
- [21] Grimmitt RH. Liquid nitrogen therapy. *Arch Dermatol.* 1961; 83(4):563-7.
- [22] Zimmerman EE, Crawford P. Cutaneous cryosurgery. *Am Fam Physician.* 2012; 86(12):1118-24.
- [23] Hoffmann NE, Bischof JC. The cryobiology of cryosurgical injury. *Urology.* 2002;60(2):40-9.
- [24] Prasad M, Kale TP, Halli R, Kotrashetti SM, Baliga SD. Liquid nitrogen cryotherapy in the management of oral lesions: a retrospective clinical study. *J Maxillofac Oral Surg.* 2009 8(1):40-2.
- [25] Vyasarayani P; Madhumietha A; Gundlapalle P. Management of geriatric patient with epulis fissuratum using liquid nitrogen cryosurgery: a case report. *J Indian Prosthodont Soc.* 2014; 14(1):115-9.
- [26] Kumar S, Bhat GS, Bhat KM. Development in techniques for gingival depigmentation: an update. *Indian J Dentist.* 2012;3(4):213-21.
- [27] Singh V, Giliyar SB, Kumar S, Bhat M. Comparative Evaluation of Gingival Depigmentation by Diode Laser and Cryosurgery Using Tetrafluoroethane: 18-Month Follow-Up. *Clinical Advances in Periodontics.* 2012; 2(3):129-34.
- [28] Kumar S, Bhat GS, Bhat KM. Effectiveness of cryogen tetrafluoroethane on elimination of gingival epithelium and its clinical application in gingival depigmentation-histological findings and case series *J Clin Diagn Res.* 2013; 7(12):3070-2.
- [29] Nishida H, Yamamoto N, Tanzawa Y, Tsuchiya H. Cryoimmunology for malignant bone and soft-tissue tumors. *Int J Clin Oncol.* 2011; 16(2):109-17.

- [30]Maccini M, Sehr D, Pompeo A, Chicoli FA, Molina WR, Fernando, Kim FJ. Biophysiological Considerations in Cryoablation: A Practical Mechanistic Molecular Review. *Int Braz J Urol.* 2011; 37(6):693-6.
- [31]Hausamen JE. The basis technique and indication for cryosurgery in tumors of the oral cavity and face. *J Oral Surg.* 1975; 33(7):546-7.
- [32]Poswillo DE. Applications of cryosurgery in dentistry. *Dent. Update.* 1978; 5(1):27-30.
- [33]Leopard PJ, Poswillo DE. Practical cryosurgery for oral lesions. *Br Dent J.* 1974; 136(5):185-96.
- [34]Marciani RD, Trodahl JM. Postoperative sequelae of cryosurgery. *J Oral Surg.* 1975; 33(6):458-61.
- [35]Tal H, Cohen MA, Lemmer J. Clinical and histological changes following cryotherapy in a case of widespread oral leukoplakia. *Int J Oral Surg.* 1982;11(1):64-8.
- [36]Toida M, Ishimaru JI, Hobo N. A simple cryosurgical method for treatment of oral mucous cysts. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 1993; 22(6):353-5.
- [37]Marcushamer M, King DL, Ruano NS. Cryosurgery in the management of mucoceles in children. *Pediatr Dent.* 1997;19(4):292-3.
- [38]Lemos-Júnior CA. Criocirurgia em lesões benignas da mucosa bucal: revisão da literatura e sua avaliação clínica em 37 casos [Dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, 1999.
- [39]Santos AMB. Análise morfológica do efeito de diferentes protocolos de nitrogênio líquido sobre a mucosa bucal: estudo em ratos. Porto Alegre, 2002. 140 f. Tese de Doutorado.
- [40]Silva FM. Estudo das características histológicas do processo de reparo após aplicação de nitrogênio líquido em tecido ósseo em mandíbulas de coelho [Tese de Doutorado]. Porto Alegre: Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2003.
- [41]Hurt WC, Nabers CL, Rose GG. Some clinical and histologic observations of gingiva treated by cryotherapy. *J Periodont.* 1972; 43(3):151-6.
- [42]Buch B, Papert AI, Shear M. Microscopic changes in rat tongue following experimental cryosurgery. *J Oral Pathol.* 1979; 8(2):94-102.
- [43]Whittaker DK. Early cellular changes following cryosurgery of oral mucosa in hamsters. *J Oral Pathol.* 1980;9(4): 235-45.
- [44]Whittaker DK. Mechanisms of tissue destruction following cryosurgery. *Ann R Coll Surg Engl.* 1984;66(5):313-8.
- [45]Valente FS. Terapia tópica na cicatrização de lesões cutâneas provocadas por congelamento com nitrogênio líquido em ratos Wistar [Tese de Mestrado]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Faculdade de Veterinária, 2014.
- [46]Sako K, Marchetta FC, Hayes RL. Cryotherapy of intraoral leucoplakia. *Am J Surg.* 1972; 124(4):481-3.
- [47]Poswillo DE. Cryosurgery of benign oral and orofacial lesions. In: Bradley PF. *Cryosurgery of the Maxillofacial Region: General Principles and Clinical Application to Benign Lesions.* Flórida: CRC Press, Boca Raton; 1986; 153-75.
- [48]Ribeiro AS, Abreu MHNG, Aparecida-Silva T, Mesquita RA. The Use of Cryosurgery in Treatment of the Gingival Leukoplakia: Report of a Case Series. *Inter J Oral Maxillofac Pathol.* 2012;3(1):28-33.
- [49]Bublitz LS, Collares; Orlandi K. Avaliação dos efeitos da crioterapia com nitrogênio líquido em Lesões hiperplásicas bucais. In: XIX CIC da UFPel. Anais; 2010 nov 9-12; Pelotas, Brasil. Rio Grande do Sul: XIX CIC; 2010; 82.
- [50]Pogrel MA, Yen CK, Taylor R. A study of infrared thermographic assessment of liquid nitrogen cryotherapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1996;81(4):396-401.
- [51]Scortegagna A, Sant'Ana-Filho M. Análise microscópica de enxerto ósseo autógeno em mandíbula de coelhos submetida à crioterapia com nitrogênio líquido. *Rev odontol ciênc.* 2004; 19(46):332-7.
- [52]Reade PC. Cryosurgery in clinical dental practice. *Int Dent J.* 1979; 29(1):1-11.
- [53]Gongloff RK, Gage AA. Cryosurgical treatment of oral lesions: report of cases. *J Am Dent Assoc.* 1983; 106(1):47-51.

