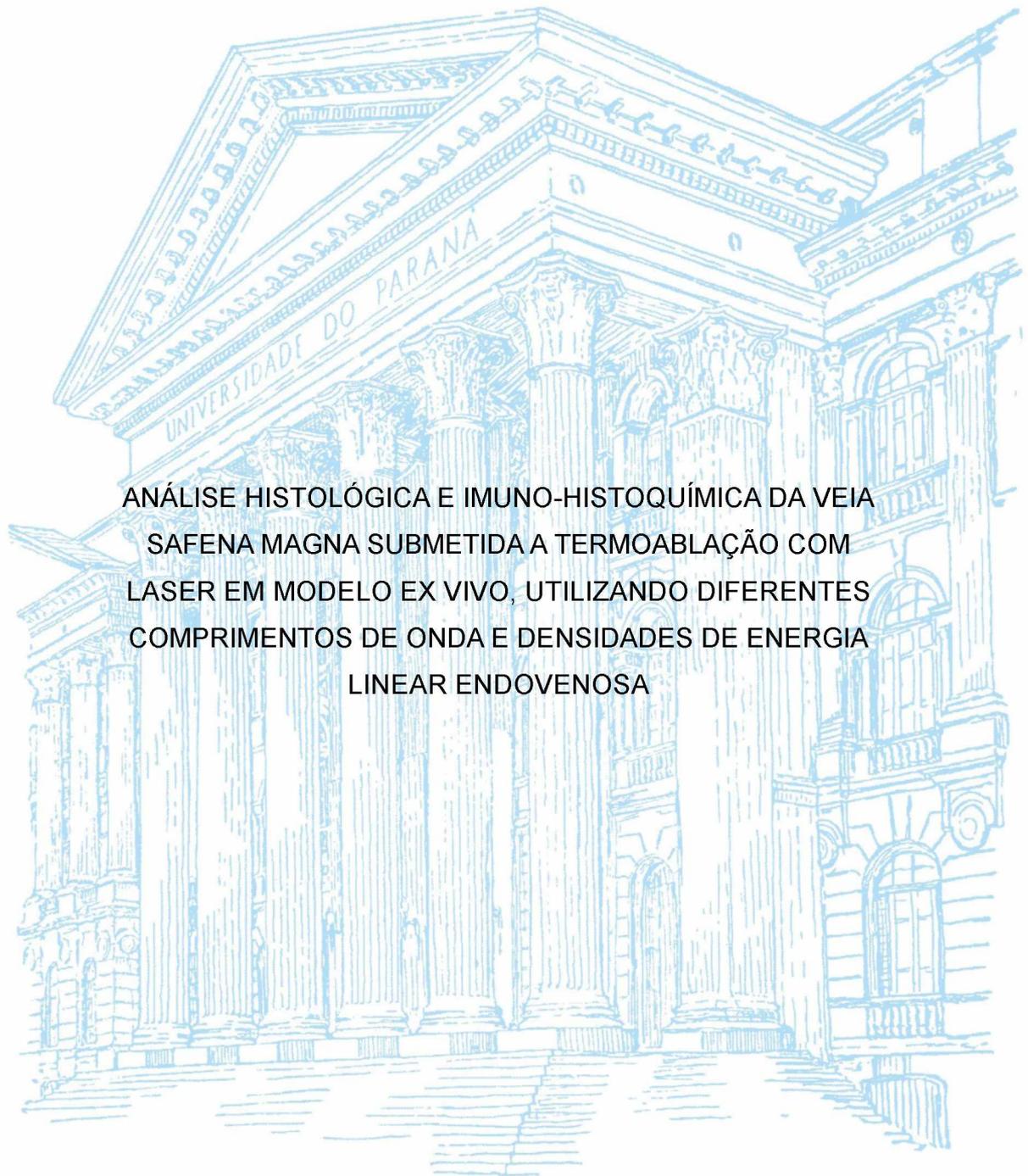


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

WALTER JUNIOR BOIM DE ARAUJO



ANÁLISE HISTOLÓGICA E IMUNO-HISTOQUÍMICA DA VEIA
SAFENA MAGNA SUBMETIDA A TERMOABLAÇÃO COM
LASER EM MODELO EX VIVO, UTILIZANDO DIFERENTES
COMPRIMENTOS DE ONDA E DENSIDADES DE ENERGIA
LINEAR ENDOVENOSA

CURITIBA

2018

WALTER JUNIOR BOIM DE ARAUJO

ANÁLISE HISTOLÓGICA E IMUNO-HISTOQUÍMICA DA VEIA SAFENA MAGNA
SUBMETIDA A TERMOABLAÇÃO COM LASER EM MODELO EX VIVO,
UTILIZANDO DIFERENTES COMPRIMENTOS DE ONDA E DENSIDADES DE
ENERGIA LINEAR ENDOVENOSA

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Clínica Cirúrgica do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Clínica Cirúrgica.

Orientador: Prof. Dr. Jorge R. Ribas Timi

CURITIBA
2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELO SISTEMA DE BIBLIOTECAS/UFPR
BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE, BIBLIOTECÁRIA: RAQUEL PINHEIRO COSTA
JORDÃO CRB 9/991 COM OS DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Araujo, Walter Junior Boim de

Análise histológica e imuno-histoquímica da veia safena magna submetida a termoablação com laser em modelo ex vivo, utilizando diferentes comprimentos de onda e densidades de energia linear endovenosa. / Walter Junior Boim de Araujo – Curitiba, 2018.

82 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Jorge R. Ribas Timi.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

1. Varizes. 2. Laser endovenoso. 3. Ablação térmica. I.Timi, Jorge R. Ribas. II. Programa de Pós-graduação em Clínica Cirúrgica. Universidade Federal do Paraná. III.Título.

NLMC: WG 620



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MEDICINA (CLÍNICA
CIRÚRGICA)

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em MEDICINA (CLÍNICA CIRÚRGICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de WALTER JUNIOR BOIM DE ARAUJO intitulada: ANÁLISE HISTOLÓGICA E IMUNO-HISTOQUÍMICA DA VEIA SAFENA MAGNA SUBMETIDA A TERMOABLAÇÃO COM LASER EM MODELO EX VIVO, UTILIZANDO DIFERENTES COMPRIMENTOS DE ONDA E DENSIDADES DE ENERGIA LINEAR ENDOVENOSA, após terem ouvido o aluno e realizado a avaliação do trabalho são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

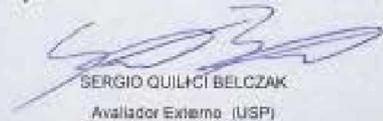
CURITIBA, 30 de Novembro de 2018.



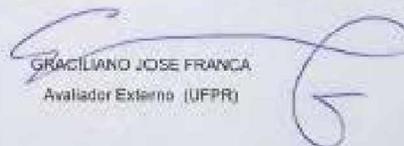
JORGE RUBINO RIBAS TIMI
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)



LUIZ MARCELO AJELLO VIARENCO
Avaliador Externo (UNICAMP)



SERGIO QUILICI BELCZAK
Avaliador Externo (USP)



GRACILIANO JOSE FRANCA
Avaliador Externo (UFPR)

À minha amada esposa Gisele e à minha querida filha Laura, que sempre estiveram ao meu lado e que de forma especial e carinhosa suportaram todos os momentos de ausência e me deram força, coragem e apoio, fazendo essa vida valer cada vez mais a pena.

Aos meus pais Walter, Selma, a minha irmã Samara e a toda minha família que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.
Tenham a minha eterna gratidão.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Paraná (UFPR) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) que viabilizaram a realização do curso.

Ao Prof. Dr. Antônio Carlos Ligocki Campos, Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da UFPR, pela confiança e aceite neste Programa.

Ao Prof. Dr. Jorge R. Ribas Timi, pela orientação acadêmica na elaboração deste trabalho, pelo apoio, amizade e por ser um exemplo a ser seguido na área da Cirurgia Vasculuar.

Aos colegas de pós-graduação Fabiano Luiz Erzinger e Filipe Carlos Caron, pelo convívio, amizade e pela colaboração na execução e elaboração deste projeto.

Aos meus amigos e colegas de profissão: Adriana Buechner de Freitas Brandão, Alan Knolseisen Cambrussi, Alfredo Ferreira Junior, Daniela Franco de Souza Colombo, Fernanda de Oliveira Mauro, Gustavo Carvalho, Rodrigo Coelho Macedo, Viviane Gomes Milgioransa, pelo convívio e amizade que nos unem em prol dos pacientes.

Aos residentes e ex-residentes do Serviço de Cirurgia Vasculuar e Endovascular do Hospital Angelina Caron – Instituto da Circulação, pelo convívio e estímulo da manutenção da procura incessante pela busca do conhecimento.

Aos funcionários, anestesistas e a direção do Hospital Angelina Caron (HAC), pelo suporte técnico na realização dos procedimentos cirúrgicos e experimentais.

Ao Médico Patologista Luiz Roberto Kotze e ao Biólogo Cleber Rafael Vieira da Costa, do laboratório Biópsia situado em Curitiba – PR, pela valiosa execução da análise histológica e imuno-histoquímica do estudo.

Aos estatísticos Marcia e Ary pela valiosa contribuição na análise estatística.

Ao Secretário da Coordenação do Programa de Pós-graduação em Clínica Cirúrgica – UFPR, Marcio Roberto Guimaro pela ajuda nas diferentes fases dessa tese.

Ao Prof. Dr. Roberto Kasuo Miyake pela amizade e pelo empréstimo do dispositivo de tração automática de fibra utilizada nesse trabalho.

Ao Luis Mateus Nakamura diretor da DMC e Cardio & Endo Luminal por seu generoso empréstimo dos aparelhos de laser utilizados neste estudo.

Aos pacientes que muito nos estimulam, motivando a busca por contínua evolução científica e profissional.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

“Precisamos dar um sentido humano às nossas construções. E, quando o amor ao dinheiro, ao sucesso nos estiver deixando cegos, saibamos fazer pausas para olhar os lírios do campo e as aves do céu.”

Érico Veríssimo

RESUMO

Introdução: O objetivo da ablação por laser endovenoso (EVLA) é abolir o fluxo sanguíneo retrógrado patológico, obliterando persistentemente o lúmen venoso. Os ajustes dos parâmetros de comprimento de onda e de densidade de energia linear endovenosa (LEED) seriam capazes de fornecer o melhor equilíbrio entre uma alta taxa de sucesso anatômico e uma baixa taxa de complicações relacionadas ao procedimento.

Objetivos: Avaliar as alterações histológicas e imuno-histoquímicas da veia safena magna após a termoablação por laser endovenoso utilizando dois comprimentos de ondas diferentes (1470 x 1940 nm) E diferentes valores de densidade de energia linear endovenosa (LEED) (50 x 100 J/cm).

Método: Os segmentos de veia do estudo foram obtidos a partir da fleboextração da veia safena magna por eversão. Os grupos foram divididos em um grupo controle e quatro grupos submetidos a termoablação ex vivo (GC: Grupo controle; A: 1470 nm, 50 J/cm; B: 1470 nm, 100 J/cm C: 1940 nm, 50 J/cm; D: 1940 nm, 100 J/cm). Cinquenta segmentos venosos (10 segmentos por grupo) foram analisados. As alterações foram classificadas em alterações de baixa temperatura, de temperatura moderada, de temperatura alta e de temperatura muito alta. **Resultados:** Na camada íntima as alterações de baixa temperatura e as alterações de temperatura moderada foram significativamente mais prevalentes no grupo A (65,4%) do que no grupo D ($p < 0,001$). Na camada média as alterações de baixa temperatura e as alterações de temperatura moderada foram mais prevalentes nos grupos A e C (77,4% e 75,0%, respectivamente). Na camada adventícia, 100% das alterações no grupo A foram de baixa temperatura e de temperatura moderada.

Conclusões: O laser de comprimento de onda de 1940 nm com a densidade de energia linear endovenosa de 100 J / cm, foi excessivamente destrutivo para as camadas íntima e média causando uma alta taxa de danos térmicos de alto grau. Estes resultados corroboram a possibilidade de se utilizar densidades de energia endovenosa linear menores com dispositivos de 1940-nm para conseguir a oclusão eficaz com menos danos térmicos de alto grau para as camadas íntima e média, bem como para evitar danos da camada adventícia e tecidos perivenosos, incluindo perfuração venosa e suas prováveis consequências clínicas.

Palavras-chave: Varizes. Laser endovenoso. Ablação térmica.

ABSTRACT

Introduction: The objective of endovenous laser ablation (EVLA) is to abolish pathologic retrograde blood flow by persistently obliterating the venous lumen. Optimal wavelength and linear endovenous energy density (LEED) settings would be able to provide the best balance between a high anatomical success rate and a low procedure-related complication rate.

Objectives: To evaluate histological and immunohistochemical changes in the great saphenous vein after endovenous laser ablation at two different wavelengths (1470 vs. 1940 nm) and linear endovenous energy density values (50 vs. 100 J/cm).

Method: Segments were obtained from the conventional eversion removal of great saphenous vein and divided into a control group and four groups for ex vivo irradiation (control group; A: 1470 nm, 50 J/cm; B: 1470 nm, 100 J/cm; C: 1940 nm, 50 J/cm; D: 1940 nm, 100 J/cm). Fifty venous segments (n.10/group) were analyzed. Changes were classified into low-temperature changes, moderate-temperature changes, high-temperature changes, and very high-temperature changes. **Results:** In the intima, low-temperature changes + moderate-temperature changes were significantly more prevalent in group A (65.4%) than in D (p.0.001). In the media, low-temperature changes.moderate-temperature changes were achieved mostly in groups A and C (77.4% and 75.0%, respectively). In adventitia fragments, 100% of changes in group A were low-temperature changes.moderate-temperature changes. **Conclusions:** The 1940-nm laser wavelength with linear endovenous energy density of 100 J/cm was excessively destructive to the intima and media causing a high rate of high-grade thermal damage. These findings corroborate the possibility of using lower linear endovenous energy densities with 1940-nm devices to achieve effective occlusion with less high grade thermal damage to the intima and media, as well as to prevent damages to the adventitia and perivenous tissues, including venous perforation and its attendant clinical consequences.

Keywords: Varicose veins. Endovenous thermal ablation.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA1 - TIPOS DE FIBRA. FIBRA NUA (BARE FIBER) (A), FIBRA RADIAL (B) E A FIBRA RADIAL DE DUPLO ANEL (C).....	23
FIGURA 2 - TÉCNICA HISTOLÓGICA DE HE NA PORÇÃO CENTRAL DA VEIA SUBMETIDA A TERMOABLAÇÃO; AMPLIAÇÕES DE 200X (A) E 400X (B).....	27
FIGURA 3 - TÉCNICA HISTOQUÍMICA DE FIBRA ELÁSTICA NA PORÇÃO CENTRAL DA VEIA SUBMETIDA A TERMOABLAÇÃO; AMPLIAÇÕES DE 200X (A) E 400X (B)	28
FIGURA 4 - TÉCNICA HISTOQUÍMICA DE TRICRÔMICO DE GOMORI NA PORÇÃO CENTRAL DA VEIA SUBMETIDA A TERMOABLAÇÃO; AMPLIAÇÕES DE 200X (A) E 400X (B)	29
FIGURA 5 - EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DE ACTINA DE MÚSCULO LISO DA PORÇÃO CENTRAL DA VEIA SUBMETIDA A TERMOABLAÇÃO; AMPLIAÇÕES DE 100X (A) E 200X (B).....	30
FIGURA 6 - MATERIAIS UTILIZADOS PARA A CONFECÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL	33
FIGURA 7 - ETAPAS PARA PREPARO DO MODELO EXPERIMENTAL.....	35
FIGURA 8 - MODELO EXPERIMENTAL COM O SEGMENTO DE VEIA SAFENA ESTICADO E AMARRADO	36
FIGURA 9 - MODELO EXPERIMENTAL NO INÍCIO DA TERMOABLAÇÃO	37
FIGURA 10 - GERADORES DE LASER DÍODO EMISSOR DE 1470-NM (A) E 1940 NM (B).....	37
FIGURA 11- DIVISÃO DOS GRUPOS DE PARÂMETROS DE TERMOABLAÇÃO	38
FIGURA 12 - ANÁLISE HISTOQUÍMICA DE FIBRAS ELÁSTICAS NO CENTRO DE SEGMENTO DE VSM NÃO SUBMETIDA A TERMOABLAÇÃO (A) E LESÃO POR TEMPERATURA BAIXA (LTC) (B).....	39
FIGURA 13 - APARÊNCIA HISTOLÓGICA NO CENTRO DE SEGMENTO DE VSM NÃO SUBMETIDA A TERMOABLAÇÃO (A) E LESÃO POR TEMPERATURA MODERADA (MTC) (B)	40

FIGURA 14 - COLORAÇÃO DO TRICRÔMICO DE GOMORI NO CENTRO DE SEGMENTO DE VSM NÃO SUBMETIDA A TERMOABLAÇÃO (A) E NA LESÃO POR TEMPERATURA MODERADA (MTC) (B).	40
FIGURA 15 - LESÃO POR TEMPERATURA ALTA (HTC) EVIDENCIADA NA COLORAÇÃO DE HEMATOXILINA E EOSINA - HE (A) E COLORAÇÃO DO TRICRÔMICO DE GOMORI (B)	41
FIGURA 16 - LESÃO POR TEMPERATURA MUITO ALTA (VHTCS), EVIDENCIADA NA COLORAÇÃO DE HEMATOXILINA E EOSINA - HE (A) E COLORAÇÃO DO TRICRÔMICO DE GOMORI (B)	41

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - GRAU DE ALTERAÇÃO DA CAMADA ÍNTIMA, DIVIDIDOS DE ACORDO COM A INTENSIDADE DA EXPOSIÇÃO TÉRMICA EM LESÕES DE BAIXO GRAU (LTCS + MTCS) E LESÕES DE BAIXO GRAU (LTCS + MTCS) E LESÕES DE ALTO GRAU (HTCS + VHTCS) EM CADA GRUPO	43
GRÁFICO 2 - VARIAÇÃO DO GRAU DE ALTERAÇÃO DA CAMADA MÉDIA, DIVIDIDOS DE ACORDO COM A INTENSIDADE DA EXPOSIÇÃO TÉRMICA EM LESÕES DE BAIXO GRAU (LTCS + MTCS) E LESÕES DE ALTO GRAU (HTCS + VHTCS) EM CADA GRUPO.	45
GRÁFICO 3 - VARIAÇÃO DO GRAU DE ALTERAÇÃO DA CAMADA ADVENTÍCIA, DIVIDIDOS DE ACORDO COM A INTENSIDADE DA EXPOSIÇÃO TÉRMICA EM LESÕES DE BAIXO GRAU (LTCS + MTCS) E LESÕES DE ALTO GRAU (HTCS + VHTCS) EM CADA GRUPO.....	46

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - GRUPOS DE PARÂMETROS DE TERMOABLAÇÃO (A, B, C E D)	38
TABELA 2 - VALORES DE P DOS TESTES ESTATÍSTICOS DA COMPARAÇÃO DOS GRUPOS DOIS A DOIS, PARA OS GRAUS DE ALTERAÇÃO DA CAMADA ÍNTIMA.....	44
TABELA 3 - VALORES DE P DOS TESTES ESTATÍSTICOS DA COMPARAÇÃO DOS GRUPOS DOIS A DOIS, PARA OS GRAUS DE ALTERAÇÃO DA CAMADA MÉDIA.....	45
TABELA 4 – VALORES DE P DOS TESTES ESTATÍSTICOS DA COMPARAÇÃO DOS GRUPOS DOIS A DOIS, PARA OS GRAUS DE ALTERAÇÃO DA CAMADA ADVENTÍCIA.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

CW	-	<i>“Continuous waveform”</i>
EVLA	-	<i>“Endovenous laser ablation”</i>
GC	-	Grupo Controle
HE	-	Hematoxilina e Eosina (HE)
HTCs	-	Lesões por temperatura alta
IVC	-	Insuficiência venosa crônica
J	-	Joule
LEED	-	<i>“Linear endovenous energy density”</i>
LTCs	-	Lesões por temperatura baixa
MTCs	-	Lesões por temperatura moderada
mm	-	milímetro
nm	-	Nanômetro
SIBI	-	Sistema de Bibliotecas
VHTCs	-	Lesões por temperatura muito alta
VSM	-	Veia safena magna
W	-	Watts

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	OBJETIVOS	17
2	REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1	A PAREDE VENOSA	18
2.1.1	Túnicas da parede venosa	18
2.1.1.1	Túnica íntima	18
2.1.1.2	Túnica média	18
2.1.1.3	Túnica adventícia	19
2.1.2	A veia safena varicosa	19
2.2	MODO DE AÇÃO DO LASER ENDOVENOSO	20
2.2.1	Mecanismo de ação do laser	20
2.2.2	Parâmetros físicos do laser	21
2.2.3	Comprimento de onda e espectro de absorção	21
2.2.4	Modo pulsado versus modo contínuo	22
2.2.5	Fluência e densidade de energia linear endovenosa (LEED)	22
2.2.6	Tipos de fibras	23
2.3	TEORIAS DE INTERAÇÃO LASER-TECIDO	23
2.3.1	Teoria das bolhas de vapor (<i>steam bubble</i>) e Teoria do tubo de calor.....	24
2.3.2	Teoria do contato direto	25
2.3.3	Teoria da Transferência de calor da camada de sangue carbonizado	26
2.3.4	Absorção de energia pela parede da veia	26
2.4	TÉCNICAS HISTOLÓGICAS E IMUNO-HISTOQUÍMICAS	27
2.4.1	Hematoxilina-eosina	27
2.4.2	Histoquímica de fibra elástica	28
2.4.3	Histoquímica de Tricrômico de Gomori	28
2.4.4	Imuno-histoquímica de actina de músculo liso	29
3	CASUÍSTICA E MÉTODO	31
3.1	COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS	31
3.2	AMOSTRA	31

3.3	DESCRIÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL	32
3.3.1	Materiais utilizados.....	32
3.3.2	Etapas para preparo do modelo experimental	34
3.4	DESENHO DO ESTUDO	35
3.5	ESTUDO ANÁTOMO-PATOLÓGICO E IMUNO-HISTOQUÍMICO	38
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	42
4	RESULTADOS	43
4.1	CAMADA ÍNTIMA.....	43
4.2	CAMADA MÉDIA	44
4.3	CAMADA ADVENTÍCIA	46
5	DISCUSSÃO	48
5.1	ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS APÓS A TERMOABLAÇÃO	48
5.2	COMPRIMENTOS DE ONDA	50
5.3	DENSIDADE DE ENERGIA LINEAR ENDOVENOSA (LEED)	52
5.4	TIPOS DE FIBRAS.....	53
5.5	TUMESCÊNCIA PERIVENOSA	54
5.6	DIÂMETROS DA VEIA SAFENA MAGNA	55
5.7	LIMITAÇÕES DO ESTUDO	56
6	CONCLUSÕES	57
	REFERÊNCIAS	58
	ANEXO 1 – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA	64
	ANEXO 2 – TERMO DE CONSENTIMENTO	70

1 INTRODUÇÃO

As varizes de membros inferiores são frequentemente causa de desconforto, dor, afastamento do trabalho e deterioração da qualidade de vida. (SMITH et al., 2000; KAPLAN et al., 2003).

A abordagem padrão para o tratamento cirúrgico da insuficiência da veia safena com ligadura cirúrgica e fleboextração tem sido substituída, em pacientes apropriados, por técnicas menos invasivas tais como escleroterapia, radiofreqüência, ou termoablação por laser endovenoso – EVLA. (BEALE; GOUGH, 2005).

O mecanismo de ação da termoablação com laser endovenoso (EVLA) no tratamento de varizes é baseada na geração de calor levando a dano endotelial, resultando assim no espessamento e fibrose com oclusão não-trombótica das veias incompetentes. (MIN; KHILNANI; ZIMMET, 2003).

A intensidade de contração da parede venosa parece ser importante, pois o lúmen residual da veia após o tratamento com laser é sujeito a oclusão pela formação de coágulos. Este coágulo posteriormente pode sofrer o processo de recanalização. Nestes casos, a irradiação com laser não é suficiente para aquecer a parede do vaso, porque a energia de luz é quase inteiramente absorvida pelo sangue, e a taxa de sucesso inicial é principalmente devido a um efeito trombótico que após a dissolução do trombo leva a uma recanalização da veia. (PROEBSTLE et al., 2002).

Alguns estudos indicam que o objetivo de oclusão venosa é conseguido em 88-100% dos membros com baixas taxas de recanalização e de necessidade de re-tratamento. (MUNDY et al., 2005).

Os parâmetros do tratamento por EVLA demonstraram-se importantes em alterar os resultados dos pacientes tratados por esta técnica. Incluem-se nesses parâmetros a potência, o comprimento de onda, a densidade de energia linear endovenosa (LEED) e o tipo de fibra. (KABNICK, 2012).

Esses parâmetros estariam próximos do ideal se conseguissem proporcionar o melhor equilíbrio entre uma elevada taxa de sucesso anatômico e uma baixa taxa de complicações relacionadas ao procedimento.

1.1 OBJETIVOS

A proposta desse estudo é avaliar as alterações histológicas e imuno-histoquímicas da veia safena magna (VSM) submetida a termoablação com laser endovenoso em modelo ex vivo, utilizando aparelhos de laser com os comprimentos de onda 1470 nm e 1940 nm e diferentes densidades de energia linear endovenosa (LEED: 50 J/cm e 100 J/cm).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A PAREDE VENOSA

A parede venosa é constituída por células endoteliais, musculares lisas, fibroblastos e pericitos entremeados por uma matriz extracelular complexa com a qual as células interagem e cujo conhecimento de sua constituição histológica e bioquímica muito contribuiu para o entendimento da fisiologia e da patologia vascular. (SILVEIRA; PORTO, 1993).

2.1.1 Túnicas da parede venosa

A estrutura dos vasos sanguíneos é constituída por três túnicas: íntima, média e adventícia. (CORMACK, 1991).

2.1.1.1 Túnica íntima

A túnica íntima apresenta uma camada de células endoteliais que reveste a superfície interna do vaso. Esse endotélio apoia-se na camada subendotelial que consiste em tecido conjuntivo frouxo muito delicado e que ocasionalmente pode apresentar células musculares lisas esparsas. (RHODIN, 1980).

As veias, principalmente de calibre pequeno ou médio, apresentam válvulas no seu interior. As válvulas são dobras da camada íntima das veias, possuem o formato de semilua e fazem saliência para a luz do vaso. São formadas por tecido conjuntivo elástico e revestidas por endotélio nas suas duas faces. (RHODIN, 1980).

2.1.1.2 Túnica média

A túnica média é formada principalmente por fibras musculares lisas, dispostas circularmente, às quais se agregam quantidades variáveis de elastina, colágeno e proteoglicanas. As células musculares lisas são metabolicamente muito ativas nesse local sendo responsáveis pela síntese do material extracelular: colágeno, elastina e proteoglicanas. (RHODIN, 1980).

2.1.1.3 Túnica adventícia

A túnica adventícia é formada principalmente de fibras colágenas e elásticas. Nas veias de médio calibre a adventícia é muito desenvolvida. Ela se continua gradativamente com o tecido conjuntivo dos órgãos vizinhos e os vasos de grande calibre em geral apresentam os *vasa vasorum* (vasos dos vasos).

Os *vasa vasorum* são arteríolas e vênulas que se ramificam profusamente e desempenham função nutridora das túnicas adventícia e média, onde devido a grande espessura da sua parede, os metabólitos não chegariam por difusão a partir da luz do vaso. A maior abundância de *vasa vasorum* nas veias é atribuída à pobreza do sangue venoso em nutrientes. (RHODIN, 1980).

2.1.2 A veia safena varicosa

A veia safena magna é constituída por três túnicas e não está incluída na classificação histológica geral e arbitrária de veias de grande, médio e pequenos calibres. É considerada uma veia diferenciada, com adaptações funcionais, possuindo um rico suprimento de musculatura lisa. A túnica íntima apresenta endotélio e tecido conjuntivo subjacente, com uma lâmina elástica interna incompleta, além de fibras musculares lisas orientadas longitudinalmente ao vaso. (SIMIONESCU, N.; SIMIONESCU, M.; 1983). A túnica média contém camadas musculares entremeadas com tecido conjuntivo. A túnica adventícia compõe-se de fibras colágenas, fibras elásticas, vasos sanguíneos (*vasa vasorum*) e células do tecido conjuntivo (fibroblastos, principalmente).

As veias, em geral, são supridas por *vasa vasorum* em maior quantidade do que as artérias, localizadas predominantemente na adventícia e, por vezes, alcançando a média; apresentando, ainda, um sistema de valvas. Uma vez que a parede venosa perca sua elasticidade, há uma tendência a dilatação, em consequência do esforço para suportar uma coluna de sangue contra a força da gravidade. As veias tornam-se irregulares e tortuosas além de exibirem incompetência das valvas, passando a ser denominadas varizes. (CORMACK, 1991).

Carvalho et al. (1988) estudaram as alterações morfológicas e histoquímicas em veias safenas normais e varicosas e concluíram que:

- A veia varicosa mostra um aumento relativo de músculo liso nos segmentos

espessados;

- A musculatura lisa da veia safena varicosa se apresentou mais corada do que a veia normal;

- Existe um aumento da positividade para proteoglicanas ácidas na parede das veias alteradas quando comparada com a veia safena normal;

- As fibras elásticas, dispostas normalmente na média e adventícia da veia safena normal, apresentam-se fragmentadas nas veias alteradas;

- As fibras elásticas dispostas nas tunicas média e íntima da veia safena normal, mostram-se aumentadas em número na veia varicosa. (CARVALHO et al., 1988).

2.2 MODO DE AÇÃO DO LASER ENDOVENOSO

O objetivo final do tratamento com o laser endovenoso é a abolição do refluxo patológico de sangue por obliteração persistente do lúmen da veia. Em geral, isto pode ser conseguido pelo encolhimento da veia até que sua luz desapareça completamente, ou por danos substanciais ao endotélio e a parede da veia levando a obliteração do lúmen secundária por um coágulo, semelhante ao efeito de um esclerosante.

2.2.1 Mecanismo de ação do laser

O termo LASER é uma sigla que significa Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation, ou seja, Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação. É um dispositivo que produz radiação eletromagnética com as seguintes características. (SIEGMAN, 1986; HECHT, 2008):

- Monocromaticidade: todos os fótons emitidos pelo laser são idênticos, o que equivale a dizer que todas as ondas apresentam o mesmo comprimento de onda. É a propriedade associada ao fato de todas as ondas eletromagnéticas em um feixe de laser apresentarem uma mesma frequência e portanto, uma única cor.

- Coerência: relaciona-se intimamente com a habilidade do campo de radiação exibir padrões de interferências estáveis, sendo também um pré-requisito para o forte caráter unidirecional da luz do laser. As ondas eletromagnéticas (campo elétrico e magnético da radiação luminosa) em um laser oscilam em fase entre si, isto é,

guardam a mesma relação de fase do campo elétrico. Isto equivale a dizer que a relação de fase do campo elétrico é mantida fixa, em todas as posições e tempos (coerência espacial e coerência temporal).

- Colimação: os feixes de laser são normalmente unidirecionais e apresentam baixa divergência. Quanto maior a coerência (coerência espacial) maior o grau de colimação do feixe e menor a divergência espacial (menor o ângulo de abertura com respeito ao eixo de propagação do feixe).

2.2.2 Parâmetros físicos do laser

O laser de efeito fototérmico provoca reações fotofísicas não radioativas que podem ser reguladas ajustando-se vários parâmetros físicos como: comprimento de onda, tipo de administração de energia e quantidade de energia por área de superfície (fluência: Joule por centímetro quadrado – J/cm²), que dependem da potência, tempo de duração do pulso e da área de superfície.

Os efeitos fototérmicos envolvidos são basicamente efeitos fotofísicos não radioativos (movimento vibracional, cruzamento inter-sistemas e conversão interna, e subsequentes processos de relaxação vibracional) responsáveis pelo aquecimento tecidual.

O calor absorvido (J/cm³), gerado *in situ*, é proporcional ao coeficiente de absorção μ_A (cm⁻¹) multiplicado pela irradiância (W/cm²) e dependente linearmente do tempo de exposição.

2.2.3 Comprimento de onda e espectro de absorção

O coeficiente de absorção de um dado cromóforo depende do comprimento de onda que está sendo considerado. A partir das teorias básicas, os aparelhos de laser endovenoso são divididos em duas categorias baseados nos mecanismos hipotéticos de ação: comprimentos de onda específicos para hemoglobina e comprimentos de onda específicos para água.

Os lasers com comprimentos de onda específicos para hemoglobina criam bolhas de vapor no sangue como resultado da absorção da energia do laser pela hemoglobina. Estas bolhas podem causar danos a parede interna da veia até em local

remoto a partir da ponta da fibra. Pode ocorrer perfuração quando ocorre o contato direto da ponta da fibra com a parede da veia.

Os lasers de diodo com comprimento de onda 810, 940 e 980 nm são absorvidos pela hemoglobina, sendo que o 980 nm também é absorvido pela água; já os comprimentos de onda de 1320, 1470 e 1940 nm são específicos para a água, tendo como alvo a água intersticial na parede da veia. (YU et al., 2013).

O laser de comprimento de onda 1940 nm é aproximadamente 266 vezes mais absorvido pela água do que o laser 980 nm e 4,8 vezes mais absorvido pela água do que o 1470 nm. (HALE et al., 1973)

2.2.4 Modo pulsado versus modo contínuo

O laser pode ser operado em modo contínuo ou pulsado, levando-se em consideração se a potência de saída é essencialmente contínua ao longo do tempo (modo contínuo), ou é realizada na forma de impulsos de luz em um ou outro intervalo de tempo (modo pulsado).

Utilizando o modo chaveado eletronicamente, o vaso sanguíneo está exposto a uma quantidade fixa de energia a distâncias iguais. A quantidade total de energia administrada depende da distância entre pulsos (0.3 e 2 cm), duração de pulso (0.5 e 2 s) e energia (10 e 15 W). Durante o modo contínuo, a fibra de laser é tracionada constantemente e a energia total fornecida depende da velocidade do recuo e da potência.

Na maior parte dos primeiros estudos de EVLA foi utilizado o modo chaveado eletronicamente, mas a maioria dos estudos recentes utilizam o modo contínuo. A quantificação da energia total por unidade de comprimento ou de superfície é mais difícil de ser feita quando é utilizando o modo pulsado. O modo pulsado também está associado com um maior risco de efeitos adversos, tais como perfuração venosa. (VAN DEN BOS et al., 2008).

2.2.5 Fluência e densidade de energia linear endovenosa (LEED)

A fluência (J/cm^2) é o principal parâmetro para quantificar a energia emitida, porém, no que se refere à VSM, devido à heterogeneidade de calibres nos seus diversos segmentos, é muito difícil estimar a sua área. Por esse motivo a maioria dos

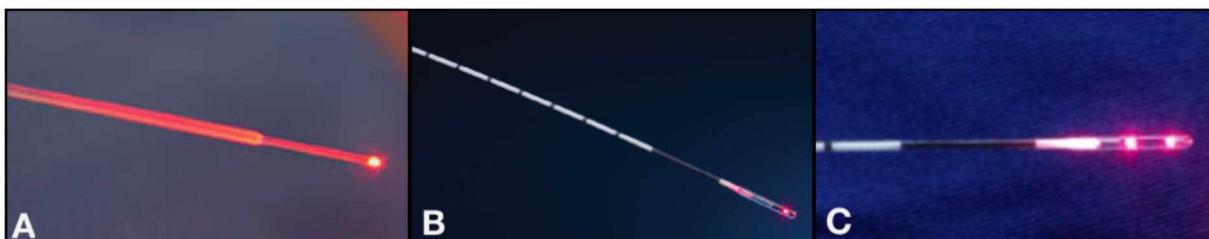
estudos utiliza, em substituição à fluência, o parâmetro energia por cm linear (J/cm), também conhecida por densidade de energia linear endovenosa (LEED). O cálculo do LEED é realizado dividindo a quantidade total de energia depositada (J) pela extensão da VSM tratada. (VAN DEN BOS et al., 2008).

2.2.6 Tipos de fibras

Existem acessíveis no mercado, basicamente 3 tipos de fibras: fibra nua (*Bare fiber*), fibra radial e a fibra radial de duplo anel.

A fibra nua (*Bare fiber*) direciona um feixe único de laser para frente a partir de sua ponta. Enquanto que a fibra radial direciona um feixe único de laser em toda a circunferência da ponta da fibra (360°) e a fibra radial de duplo anel apresenta-se com feixe duplo de laser também direcionado para toda a circunferência da ponta da fibra (360°). (FIGURA 1)

FIGURA 1 – TIPOS DE FIBRA. FIBRA NUA (BARE FIBER) (A), FIBRA RADIAL (B) E A FIBRA RADIAL DE DUPLO ANEL (C)



FONTE: O autor (2018).

2.3 TEORIAS DE INTERAÇÃO LASER-TECIDO

Quatro mecanismos foram identificados contribuindo, pelo menos teoricamente, para a eficácia do EVLA. Eles são conhecidos a longo prazo e são relacionados a mecanismos térmicos de interação laser-tecido que fazem com que o aumento da temperatura da parede da veia seja o mecanismo chave da eficácia do EVLA. (NEUMANN; VAN GEMERT, 2014).

2.3.1 Teoria das bolhas de vapor (*steam bubble*) e Teoria do tubo de calor

“No procedimento de laser endovenoso, bolhas hipercólicas turbulentas podem ser claramente vistas na ponta da fibra, enquanto a energia está sendo aplicada pela fibra intraluminal, estas bolhas de vapor se movem no sentido oposto e o fechamento da veia se dá mais adiante. Este mecanismo do laser gerando uma lesão induzida indiretamente por bolhas de vapor provenientes do sangue em ebulição foi proposta como o mecanismo fisiopatológico da ação do Laser Endovenoso.” (VUYLSTEKE et al., 2012).

Essas bolhas de vapor não são estáticas, mas elas estão em movimento vigoroso, uma vez que começam a ser produzidos. Uma mistura de sangue quente e vapor resultam em uma espécie de um fluxo de jato de tinta, responsável pela transferência de calor para partes remotas da luz da veia, o que de outra forma não estariam acessíveis ao impacto direto do laser. (PROEBSTLE et al., 2002).

Embora inicialmente a teoria de bolhas de vapor tenha tido boa aceitação como uma explicação para o mecanismo de ação de EVLA, ela parece ser imperfeita, porque não representa a maioria da energia entregue à veia no procedimento de Laser Endovenoso. Se o sangue ainda está presente no lúmen dos vasos, as bolhas de vapor começam a se formar, quando a temperatura do sangue chega a 100°C. As bolhas crescem e quando atingem uma área mais fria, elas entram em colapso. A zona de ebulição é, por conseguinte, no interior do lúmen do vaso sanguíneo e bolhas de vapor têm pouco efeito sobre a parede do vaso, principalmente nas veias maiores. (FAN; ROX-ANDERSON, 2008).

“ O Laser Endovenoso produz bolhas de ebulição que emergem dos poros no interior da ponta de fibra e que percorrem distalmente uma distância de 20 mm antes de sofrer condensação. Este mecanismo de evaporação-condensação torna a veia como um tubo de calor, onde o transporte de calor mantém uma temperatura constante de aproximadamente 100°C. Durante o Laser Endovenoso, as observações acima mencionadas indicam que um volume de cilindro da veia com um comprimento de cerca de 20 mm, é mantida a 100°C. Velocidades de retirada de alguns mm/s, em seguida, fazem com que pelo menos a parte superficial da parede da veia tratada fique perto de 100°C durante um tempo suficiente para provocar danos irreversíveis gerando um mecanismo semelhante a um tubo de calor.” (VUYLSTEKE et al., 2012).

Em conclusão, este tubo de calor provoca a condução de calor para a parede da veia, mas de uma forma ineficiente. O sangue carbonizado absorve uma grande proporção da energia emitida e dificulta uma transmissão eficiente de energia para a parede da veia.

2.3.2 Teoria do contato direto

“Quando a fibra é introduzida numa veia safena, que geralmente tem algumas pequenas tortuosidades e curvas, a fibra tem sempre uma tendência a esticar a veia. Como consequência desse alongamento, a ponta da fibra frequentemente atinge e fica em contato com a parede do vaso. Examinando a localização da fibra no controle de ultrassom perioperatório, vemos a ponta da fibra na sua maioria situada muito excentricamente na veia, com a ponta tocando a parede da veia.” (VUYLSTEKE et al., 2012).

O contato direto entre a ponta da fibra quente e a parede da veia ocorre principalmente quando fibras lineares são utilizadas. Estes pontos de contato mostram-se como áreas de carbonização de tecido, e devido a temperaturas de mais de 200°C, o contato prolongado pode perfurar a parede da veia, um efeito adverso da utilização de fibras lineares. (PROEBSTLE et al., 2002; MEISSNER et al., 2007).

“Quando se examina uma amostra de veia tratada, observamos uma linha na parede do vaso danificada por carbonização, evidenciando ulcerações e perfurações, ao passo que o resto da parede permanece inalterada. A carbonização da parede da veia pelo contato direto com a fibra desperdiça muita energia e isto por sua vez aumenta a probabilidade de perfuração assim como o aumento da dor pós-operatória, surgimento de equimoses, reações inflamatórias, e recanalizações.” (VUYLSTEKE et al., 2012).

É improvável que o contato direto da fibra com a parede é o principal mecanismo de interação no EVLA, primeiro porque os procedimentos de EVLA são eficazes sem a ação do contato direto. (VUYLSTEKE et al., 2008). E em segundo lugar, parece improvável que uma linha de desnaturação de cerca de 0,6 mm de largura na parede do vaso possa atingir a obliteração permanente de toda a circunferência da veia. (MALSKAT et al., 2014).

2.3.3 Teoria da Transferência de calor da camada de sangue carbonizado

Uma vez que a camada preta formada pelo sangue aderido na ponta da fibra absorve fortemente a luz emitida, torna-se extremamente quente, a cerca de 1000 °C, e provoca danos. (DISSELHOFF et al., 2008). O fluxo de calor é capaz de causar lesão irreversível da parede venosa. (VAN DEN BOS et al., 2009; AMZAYYB et al., 2010).

Este mecanismo foi amplamente conhecido, durante muitos anos. (VERDAASDONK et al., 1991). No entanto a descrição desse mecanismo provocou forte oposição em parte porque a camada preta formada na ponta da fibra absorve todos os comprimentos de onda igualmente bem, sugerindo, assim, praticamente nenhuma influência do comprimento de onda na eficácia do EVLA quando a fibra optica utilizada é uma fibra de contato.

2.3.4 Absorção de energia pela parede da veia

“A energia de luz entregue a partir da ponta da fibra intraluminal pode ser absorvido pela água, sangue, ou pela parede da veia. O cromóforo óptico da parede da veia é a água. Se a luz é absorvida pelo sangue intraluminal, o efeito inicial será uma obliteração trombótica. No entanto, essa energia luminosa pode ser absorvida diretamente pela parede da veia, sem contato direto entre a ponta da fibra e a parede interna da veia. Um estudo histológico in vivo em um modelo animal mostrou que, evitando o contato direto e centrando a ponta da fibra intraluminalmente, uma necrose mais circunferencial da parede da veia pode ser notada. Isso prova que o contato direto não é necessário para conseguir uma destruição eficiente da parede da veia.” (VUYLSTEKE et al., 2012).

“A energia de luz entregue intraluminalmente pode ser dispersado pelo sangue ou absorvido pelo citoplasma celular das células na parede da veia. Devido ao mecanismo fototermolítico, a temperatura deste citoplasma vai subir e a desnaturação de proteínas começará a ocorrer quando esta temperatura atingir valores acima dos 42 °C. Se este aumento de temperatura excede o intervalo de 50°C a 60°C, ocorre a desnaturação irreversível das proteínas intracelulares que conduzem a necrose celular. Um aumento de temperatura até 50°C ou mais foi medido no tecido ou no fluido tumescente ao retirar a fibra de laser.” (VUYLSTEKE et al., 2012).

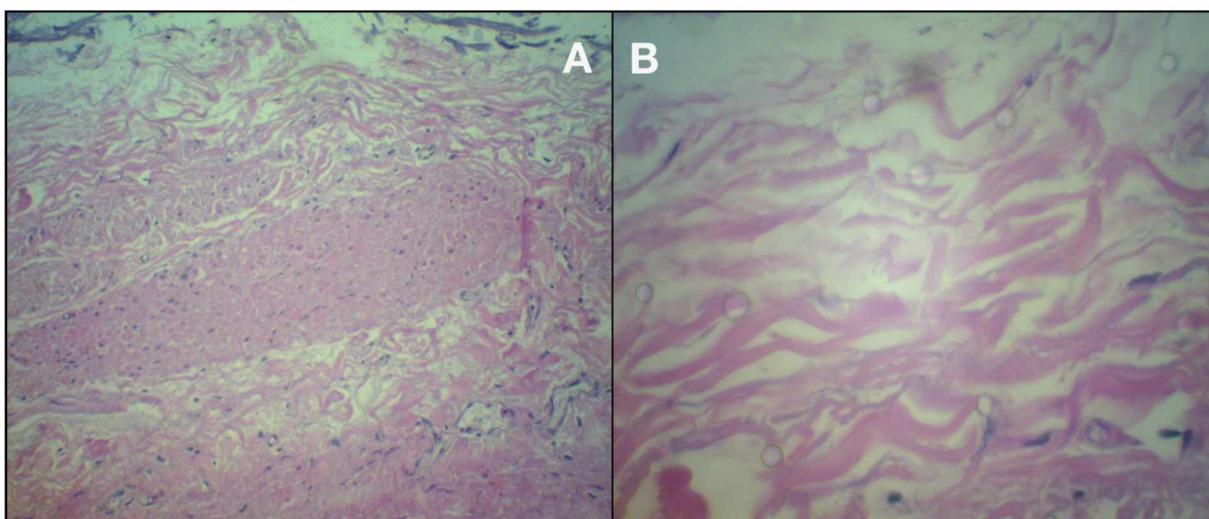
2.4 TÉCNICAS HISTOLÓGICAS E IMUNO-HISTOQUÍMICAS

2.4.1 Hematoxilina-eosina

Uma das técnicas histológicas mais utilizadas é a que reúne dois corantes chamados hematoxilina e eosina, cuja mistura é denominada abreviadamente HE ou H&E. Essa técnica é usada especialmente para a demonstração de estruturas de tecido gerais, onde as manchas de tecidos em tons de azul, rosa e vermelho reconhecem as células malignas e não malignas, bem como várias substâncias intracelulares e extracelulares necessárias para o diagnóstico de condições de doenças em tecidos e células. (AVWIORO, 2010).

Araujo et al. (2016), fizeram um estudo piloto para validação de um modelo experimental através da termoablação ex vivo de um segmento de VSM insuficiente com aparelho de laser dÍodo com comprimento de onda de 1470-nm, fibra radial, utilizando de 7 Watts de potência e mecanismo de tração automática. Após a realização da técnica histológica para estudo da morfologia do tecido, pode-se observar que após a termoablação endovenosa as células musculares não se apresentaram aderidas, evidenciando uma desorganização do tecido (FIGURA 2).

FIGURA 2 - TÉCNICA HISTOLÓGICA DE HE NA PORÇÃO CENTRAL DA VEIA SUBMETIDA A TERMOABLAÇÃO; AMPLIAÇÕES DE 200X (A) E 400X (B). OBSERVA-SE QUE AS CÉLULAS MUSCULARES NÃO SE APRESENTAM ADERIDAS EVIDENCIANDO UMA DESORGANIZAÇÃO DO TECIDO



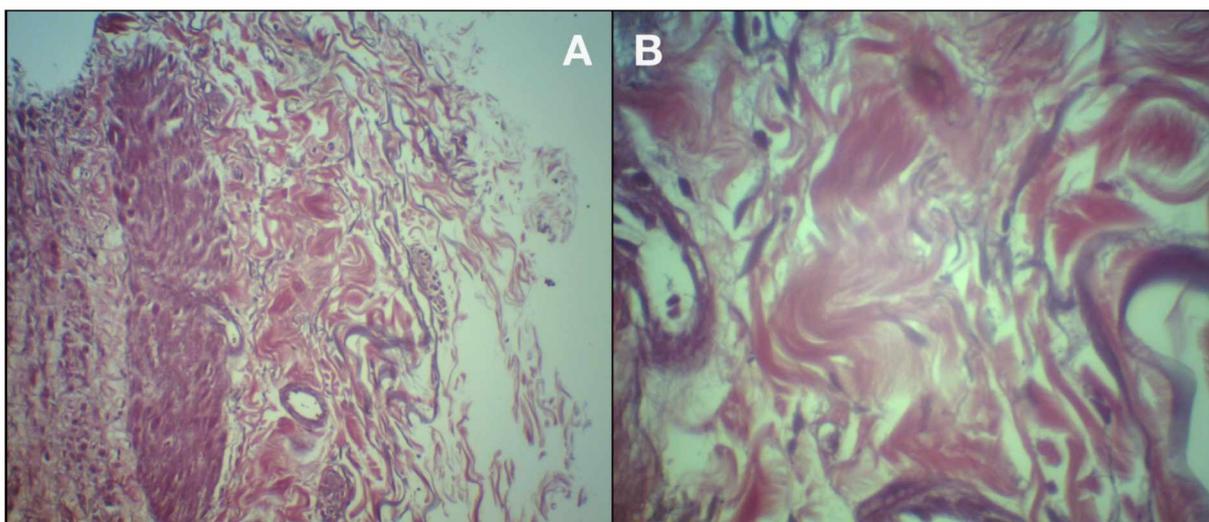
FONTE: O autor (2018).

2.4.2 Histoquímica de fibra elástica

A técnica de histoquímica de fibra elástica caracteriza-se por evidenciar as fibras elásticas na cor marrom claro. As fibras elásticas encontram-se normalmente dispostas nas camadas média e adventícia da veia safena normal; apresentando-se fragmentadas em veias varicosas.

No estudo piloto de Araujo et al. (2016), ao se realizar a análise na porção central da veia submetida a termoablação foi evidenciado uma baixa quantidade de marcação para esta proteína (FIGURA 3).

FIGURA 3 - TÉCNICA HISTOQUÍMICA DE FIBRA ELÁSTICA NA PORÇÃO CENTRAL DA VEIA SUBMETIDA A TERMOABLAÇÃO; AMPLIAÇÕES DE 200X (A) E 400X (B). EVIDENCIADO FIBRAS ELÁSTICAS DESCONTÍNUAS E DESORGANIZADAS (COR MARROM CLARO)



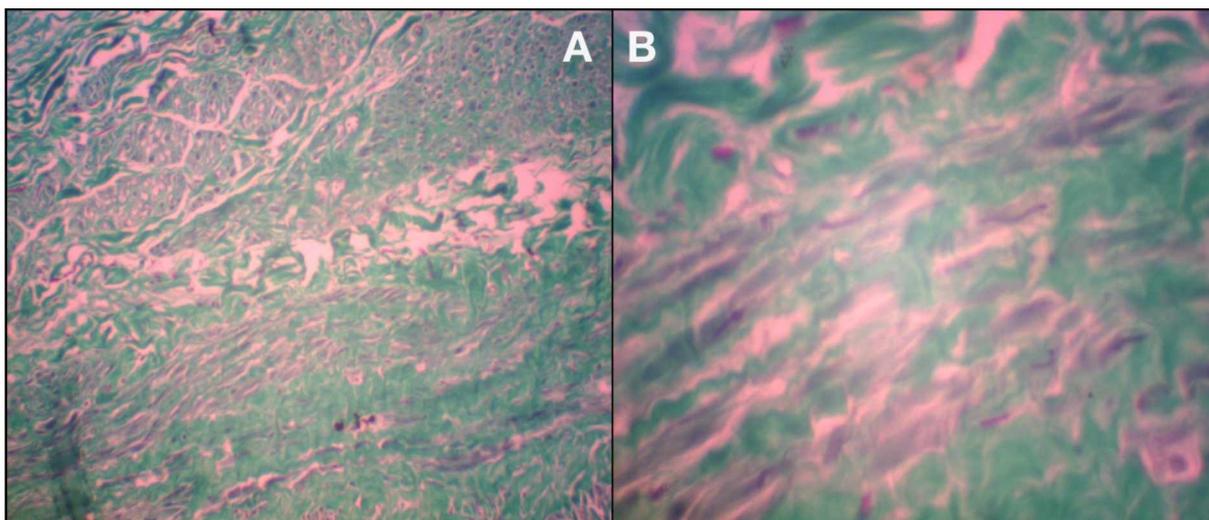
FONTE: O autor (2018).

2.4.3 Histoquímica de Tricrômico de Gomori

As colorações “tricrômicas” são utilizadas principalmente para distinguir o colágeno a partir do tecido muscular. Em geral, estas colorações consistem em corantes nucleares, colagénios e citoplasmáticos em mordentes como, por exemplo, o ácido fosfotungstíco ou ácido fosfomolibdico. Historicamente, o primeiro sistema tricrômico foi introduzido por Mallory. Posteriormente, foram apresentadas modificações por Masson, Foot e Gomori. (GOMORI, 1950).

A técnica histoquímica de Tricrômico de Gomori caracteriza-se por demonstrar as fibras musculares na cor marrom e vermelha. No estudo piloto de Araujo et al. (2016), ao se realizar a análise da porção central da veia submetida a termoablação pode-se observar a baixa quantidade de coloração vermelha (fibras musculares) (FIGURA 4).

FIGURA 4 - TÉCNICA HISTOQUÍMICA DE TRICRÔMICO DE GOMORI NA PORÇÃO CENTRAL DA VEIA SUBMETIDA A TERMOABLAÇÃO; AMPLIAÇÕES DE 200X (A) E 400X (B). EVIDENCIADO BAIXA QUANTIDADE DE COLORAÇÃO VERMELHA (FIBRAS MUSCULARES)



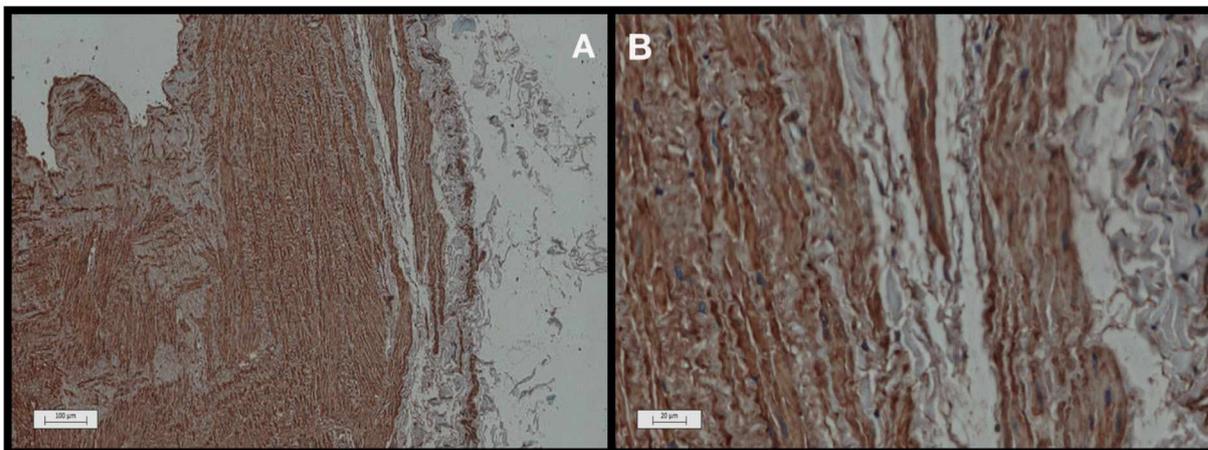
FONTE: O autor (2018).

2.4.4 Imuno-histoquímica de actina de músculo liso

O gene da actina do músculo liso é ativado durante os estágios iniciais da formação embrionária cardiovascular. Também aparece durante o desenvolvimento vascular periférico e torna-se uma proteína abundante em células musculares lisas adultas. A expressão tecido específico da actina de músculo liso parece ser necessária para a principal capacidade de geração de força da célula muscular lisa vascular. (SCHILDMEYER 2000).

A expressão imunohistoquímica de actina de músculo liso quando revelada com Horseadish Peroxidase e 3,3'-Diaminobenzidine (DAB), forma precipitados na cor marrom onde há interação com o anticorpo específico. No estudo piloto de Araujo et al. (2016), ao se realizar a análise da porção central da veia submetida a termoablação foi observado uma desorganização das fibras musculares associada a uma baixa expressão do marcador específico desse tipo de célula (FIGURA 5).

FIGURA 5 - EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DE ACTINA DE MÚSCULO LISO DA PORÇÃO CENTRAL DA VEIA SUBMETIDA A TERMOABLAÇÃO; AMPLIAÇÕES DE 100X (A) E 200X (B). EVIDENCIADO A DESORGANIZAÇÃO DAS FIBRAS MUSCULARES E TAMBÉM BAIXA EXPRESSÃO DO MARCADOR ESPECÍFICO DESSE TIPO DE CÉLULA



FONTE: O autor (2018).

3 CASUÍSTICA E MÉTODO

Este estudo faz parte da linha de pesquisa em Métodos de detecção precoce e avaliação de fatores prognósticos em afecções cirúrgicas, do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do Paraná – UFPR.

A normatização do trabalho segue as recomendações do Sistema de Bibliotecas (SIBI) da Universidade Federal do Paraná (UFPR) estabelecidas no Manual de Normalização de Documentos Científicos (20015).

3.1 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS

O projeto de pesquisa do presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital Angelina Caron (HAC) no dia 01/06/2015, sob o registro CAAE: 45209015.9.0000.5226 e segue as diretrizes do Ministério da Saúde (cf. ANEXO).

3.2 AMOSTRA

Os critérios de inclusão foram pacientes entre 18 a 70 anos de ambos os sexos, submetidos previamente ao exame de ecografia vascular com Doppler, com indicação de safenectomia através da técnica de fleboextração por eversão, cujas medidas de diâmetros da veia safena magna estavam compreendidas entre 3 mm e 10 mm e que concordaram em participar do estudo assinando o termo de consentimento.

Os critérios de exclusão foram pacientes cujos diâmetros pré-operatórios da veia safena magna foram menores que 3 mm e/ou maiores que 10 mm, pacientes com história de tromboflebite prévia na veia safena magna ou que não concordaram em participar do estudo e/ou não assinaram o termo de consentimento.

Para obtenção da veia safena magna para realização desse estudo, os pacientes com programação para tratamento cirúrgico de varizes convencional assinaram termo de consentimento autorizando a utilização ex vivo da veia safena magna removida através de fleboextração por eversão. Assim como autorizaram a coleta de 20 ml de sangue para posterior utilização no modelo ex vivo da pesquisa. O sangue utilizado para esse estudo foi posteriormente descartado em lixo próprio hospitalar.

Foram selecionados cinco pacientes que já seriam submetidos ao tratamento cirurgico de varizes através de safenectomia magna pela técnica de eversão e após a realização da fleboextração da VSM um total de 10 segmentos com cerca de 20 cm foram preparados e encaminhados para a realização da termoablação experimental.

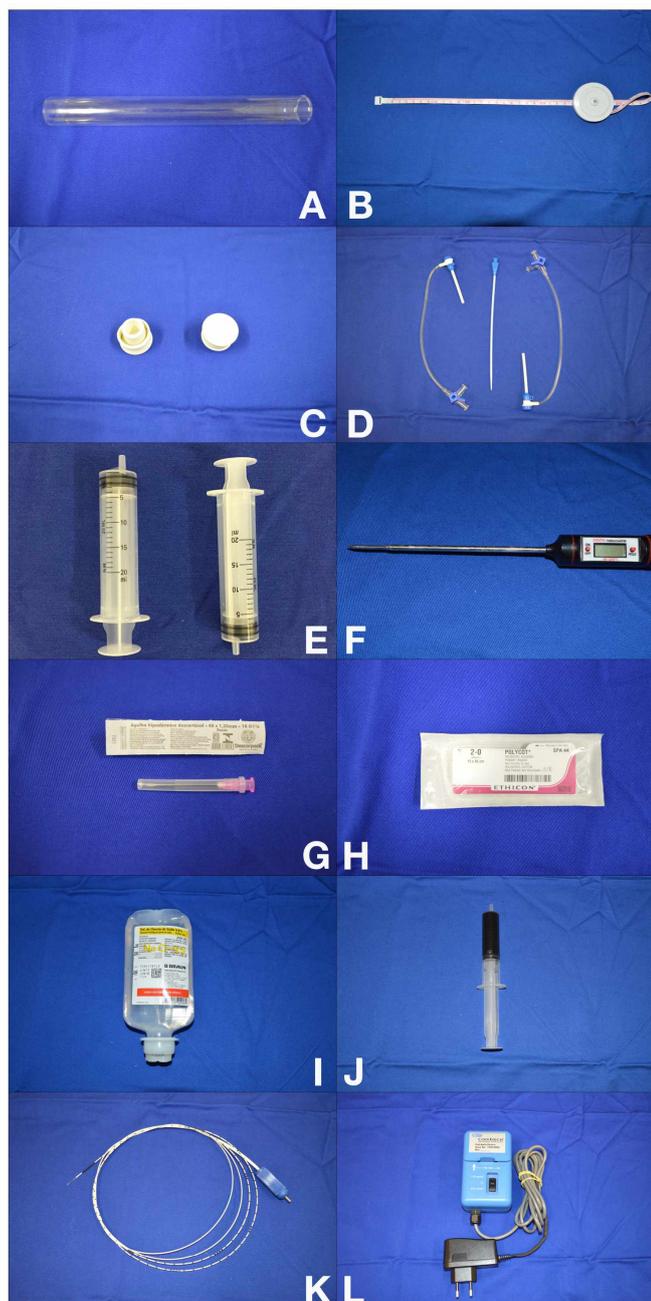
3.3 DESCRIÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL

Para realização da termoablação da VSM ex vivo, foi utilizado um modelo experimental descrito por Araujo et al. (2016), confeccionado com tubos de vidro e introdutores valvulados, capaz de reproduzir condições fisiológicas dos procedimentos de termoablação tais como tumescência e fluxo sanguíneo.

3.3.1 Materiais utilizados

Os materiais utilizados para a confecção do modelo experimental desse estudo são mostrados na figura 6. (FIGURA 6).

FIGURA 6 - MATERIAIS UTILIZADOS PARA A CONFEÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL



FONTE: O autor (2018).

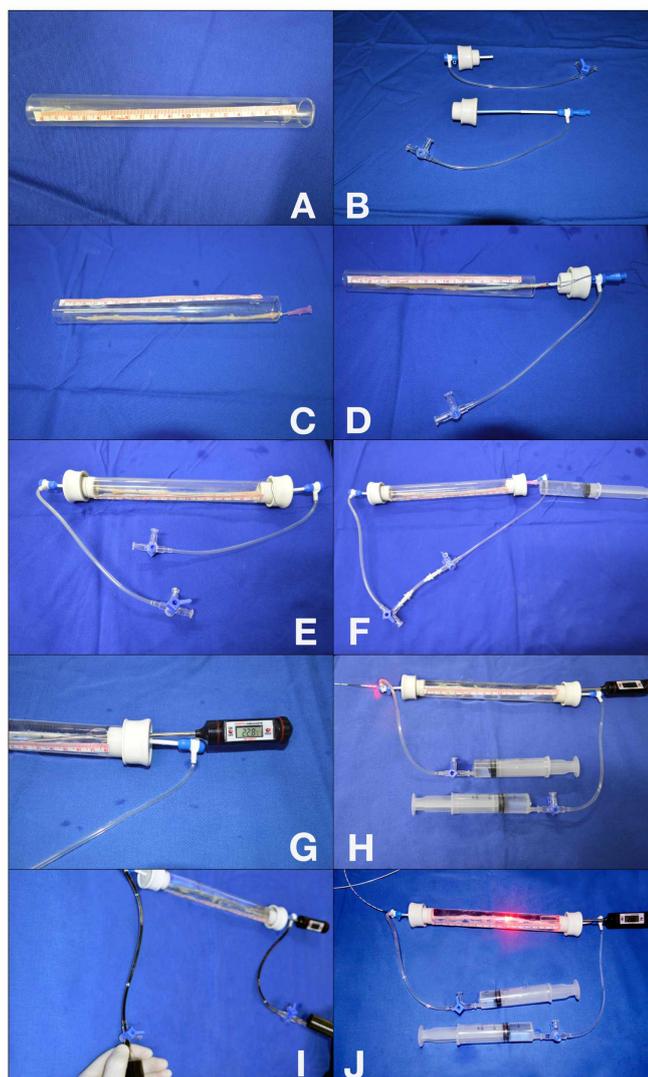
- A- Um tubo de vidro 20 mm x 20 cm com corte nas 2 extremidades; B- Fita Métrica; C- Duas tampas de borracha para tubo de vidro; D- Dois introdutores valvulados curtos 8 French; E- Duas seringas descartáveis de 20 ml; F- Termômetro digital tipo espeto (escala de temperatura -45 a +230oC); G- Uma agulha hipodérmica descartável – 40 x 12; H- Fios de algodão 2-0 sem agulha; I- Soro fisiológico 0,9% - Frasco de 100 ml; J- Sangue total coletado de um voluntário humano em frasco com anticoagulante EDTA – 20 ml; K- Fibra de laser; L- Mecanismo de tração mecânica automática da fibra.

3.3.2 Etapas para preparo do modelo experimental

Para preparo do modelo experimental foi realizado inicialmente o corte nas duas extremidades do tubo de vidro; seguido da projeção dos introdutores valvulados de 8 F através das tampas de borracha. A veia que vai ser estudada deve então ser passada através do tubo de vidro, esticada e fixada (fio algodão 2-0) em suas extremidades nas bainhas dos introdutores.

Nesse momento são colocadas as tampas de borracha nas extremidades do tubo e é realizada a infusão de soro fisiológico 0,9% no sistema através da torneirinha de um dos introdutores, seguido da punção de uma das tampas de borracha com uma agulha hipodermica e infusão de soro fisiológico no espaço ao redor da veia (tumescência). O termômetro digital do tipo espeto também é implantado através de uma das tampas de borracha. A fibra de laser é então introduzida no interior da veia através de um dos introdutores e procede-se a injeção de sangue através da torneirinha do introdutor e aspiração do conteúdo pela outra torneirinha, para simular um fluxo contínuo de sangue. Nesse momento as condições fisiológicas estão estabelecidas e pode-se dar início a termoablação (FIGURA 7).

FIGURA 7 – ETAPAS PARA PREPARO DO MODELO EXPERIMENTAL



FONTE: O autor (2018).

A- Corte nas duas extremidades do tubo de vidro; B- Projeção dos introdutores valvulados de 8 F através das tampas de borracha; C- Passagem da veia através do tubo de ensaio, sendo a mesma esticada e fixada em ambos os lados nas bainhas dos introdutores; D- Colocação das tampas de borracha nas extremidades do tubo; E- Infusão de soro fisiológico 0,9% no sistema; F- Punção de uma das tampas de borracha e infusão de soro fisiológico no espaço ao redor da veia (tumescência); G- Implante do termômetro digital do tipo espeto através de uma das tampas de borracha do sistema; H- Passagem da fibra de laser através de um dos introdutores; I- Injeção de sangue através de torneirinha do introdutor e aspiração do conteúdo pela outra torneirinha, para simular um fluxo contínuo de sangue; J- Início da termoablação.

3.4 DESENHO DO ESTUDO

As veias obtidas da cirurgia foram imediatamente seccionadas em segmentos de cerca de 20 cm de comprimento; assim como também foram seccionados segmentos de 3 cm de veia de cada amostra para composição de um grupo controle.

Os segmentos de veia safena magna de cerca de 20 cm foram posteriormente recolocados na sua posição fisiológica e preparados para posterior utilização no modelo experimental. No momento de sua utilização foram esticados e amarrados nas duas extremidades da bainha (FIGURA 8).

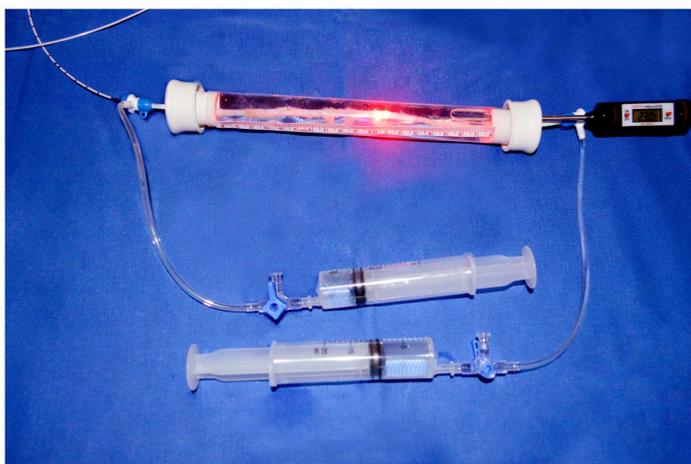
(FIGURA 8) - MODELO EXPERIMENTAL COM O SEGMENTO DE VEIA SAFENA ESTICADO E AMARRADO



FONTE: O autor (2018).

Posteriormente o tubo de vidro foi preenchido com soro fisiológico em temperatura ambiente. A fibra de laser radial foi introduzida no interior da veia através de um dos introdutores e nesse momento foi realizada a injeção de sangue humano com anticoagulante EDTA através da torneirinha do introdutor e aspiração do conteúdo pela outra torneirinha. Nesse momento em que as condições fisiológicas foram estabelecidas deu-se início a termoablação (FIGURA 9).

(FIGURA 9) - MODELO EXPERIMENTAL NO INÍCIO DA TERMOABLAÇÃO



FONTE: O autor (2018).

As experiências foram realizadas com dois geradores de laser diodo emissor de 1470-nm e 1940 nm (DMC, Brasil) (FIGURA 10), fibra radial (DMC, Brasil) e sistema de tração automática da fibra (CoolTouch Corporation, EUA).

FIGURA 10 - GERADORES DE LASER DÍODO EMISSOR DE 1470-NM (A) E 1940 NM (B)



FONTE: O autor (2018).

Dez segmentos de VSM distintos foram submetidos a termoablação. Cada segmento de veia preparado para utilização no modelo experimental foi irradiado com 4 configurações de parâmetros diferentes (TABELA 1).

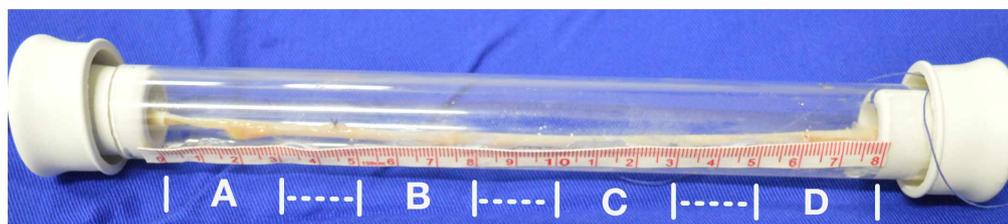
TABELA 1 - GRUPOS DE PARÂMETROS DE TERMOABLAÇÃO (A, B, C E D)

GRUPO	COMPRIMENTO DE ONDA	POTÊNCIA/LEED	VELOCIDADE DE TRAÇÃO	FIBRA
A	1470 nm	5W / 50	1mm/seg	Radial
B	1470 nm	10W / 100	1mm/seg	Radial
C	1940 nm	5W / 50	1mm/seg	Radial
D	1940 nm	10W / 100	1mm/seg	Radial

FONTE: O autor (2018).

Sendo que cada grupo foi constituído de segmentos de 3 cm de extensão, tendo sido deixado um intervalo de 2 cm de entre esses segmentos para compor uma zona de transição livre dos efeitos da termoablação (FIGURA 11).

FIGURA 11 - DIVISÃO DOS GRUPOS DE PARÂMETROS DE TERMOABLAÇÃO (A, B, C E D) (-----) ZONA DE TRANSIÇÃO LIVRE DOS EFEITOS DA TERMOABLAÇÃO



FONTE: O autor (2018).

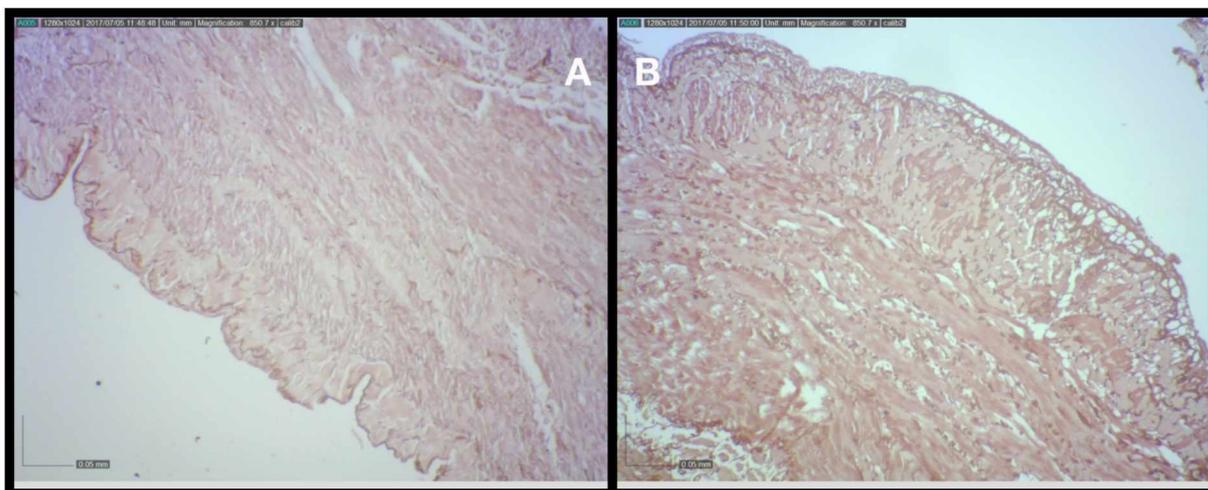
3.5 ESTUDO ANÁTOMO-PATOLÓGICO E IMUNO-HISTOQUÍMICO

Imediatamente após a irradiação, cada segmento de VSM foi removido do sistema e posteriormente foram seccionados os segmentos de 3 cm irradiados com cada configuração. Os 50 espécimes resultantes foram fixados em formalina a 10% e constituíram grupo controle GC (GC1, GC2, GC3, CG4, CG5, CG6, CG7, CG8, CG9 e CG10) e quatro grupos experimentais do estudo: grupo A (A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7, A8, A9 e A10); grupo B (B1, B2, B3, B4, B5, B6, B7, B8, B9 e B10); grupo C (C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9 e C10); e grupo D (D1, D2, D3, D4, D5, D6, D7, D8, D9 e D10).

O médico patologista encarregado pela realização das análises histológicas e imuno-histoquímicas não teve conhecimento da composição e disposição dos grupos formados pelos diferentes parâmetros. No laboratório as peças foram seccionadas em sua porção central, transversalmente ao maior eixo, de 1 em 1 mm, para processamento histológico e inclusão em parafina. De cada peça foram realizadas lâminas coradas pelas técnicas de hematoxilina e eosina (HE), histoquímica para fibra elástica, histoquímica de tricrômico de Gomori, e imuno-histoquímica de actina de músculo liso.

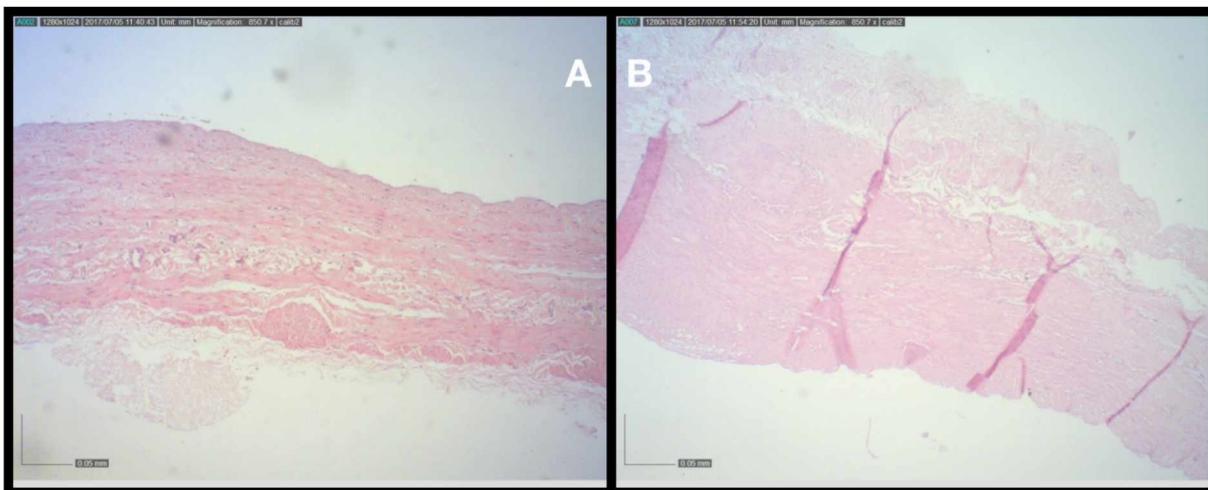
As alterações foram classificadas em 4 categorias: lesões por temperatura baixa (LTCs) indicadas por edema do músculo liso ou fibras elásticas (FIGURA 12), lesões por temperatura moderada (MTCs), incluindo a fusão ou vacuolização das fibras elásticas (FIGURA 13) e (FIGURA 14); lesões por temperatura alta (HTCs), incluindo carbonização do tecido (FIGURA 15) e lesões por temperatura muito alta (VHTCs), caracterizada pela perda de tecido (FIGURA 16).

FIGURA 12 – ANÁLISE HISTOQUÍMICA DE FIBRAS ELÁSTICAS NO CENTRO DE SEGMENTO DE VSM NÃO SUBMETIDA A TERMOABLAÇÃO; OBSERVAR QUE AS FIBRAS (CORADAS EM MARROM ESCURO) SÃO REGULARES, CONTÍNUAS E ORGANIZADAS (A) E LESÃO POR TEMPERATURA BAIXA (LTC) EM SEGMENTO DE VSM APÓS A TERMOABLAÇÃO, EVIDENCIANDO DESORGANIZAÇÃO E EDEMA / ESPAÇAMENTO DAS FIBRAS ELÁSTICAS (B)



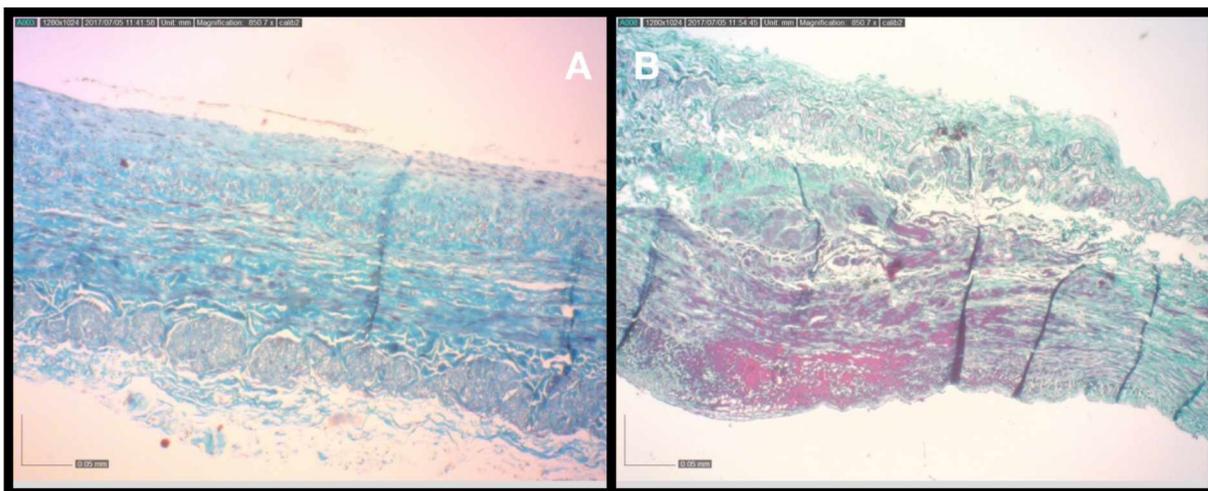
FONTE: O autor (2018)

FIGURA 13 - APARÊNCIA HISTOLÓGICA NO CENTRO DE SEGMENTO DE VSM NÃO SUBMETIDA A TERMOABLAÇÃO (A) E LESÃO POR TEMPERATURA MODERADA (MTC) EVIDENCIANDO EOSINOFILIA DA CAMADA MÉDIA, COM VACUOLIZAÇÃO DA ÍNTIMA E MÉDIA EM PORÇÃO MAIS LUMINAL (B) (HEMATOXILINA E EOSINA - HE)



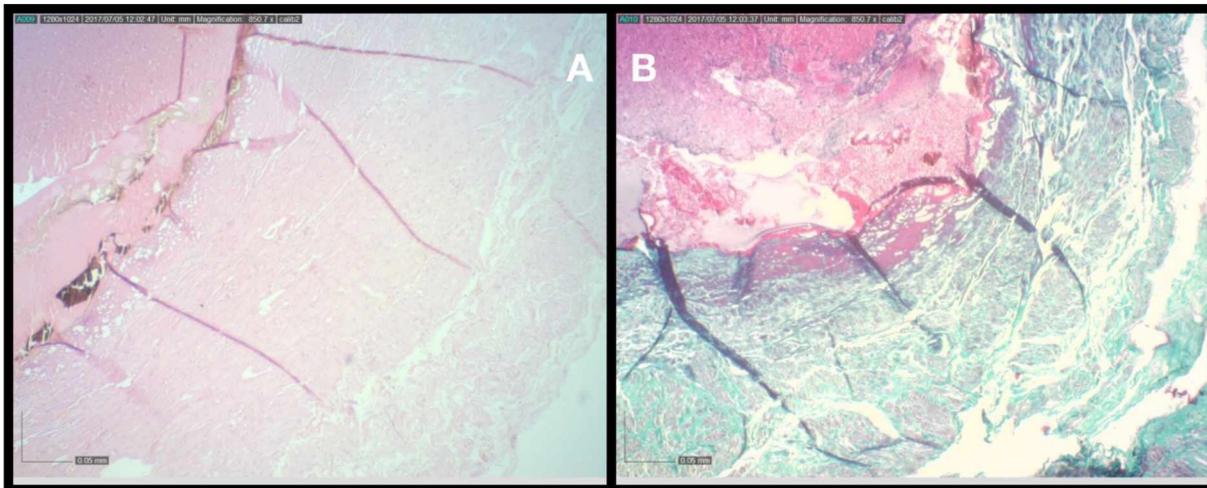
FONTE: O autor (2018).

FIGURA 14 - COLORAÇÃO DO TRICRÔMICO DE GOMORI NO CENTRO DE SEGMENTO DE VSM NÃO SUBMETIDA A TERMOABLAÇÃO (A) E NA LESÃO POR TEMPERATURA MODERADA (MTC), EVIDENCIANDO MUDANÇA DA AFINIDADE TINTORIAL (VERMELHO) E VACUOLIZAÇÃO (B)



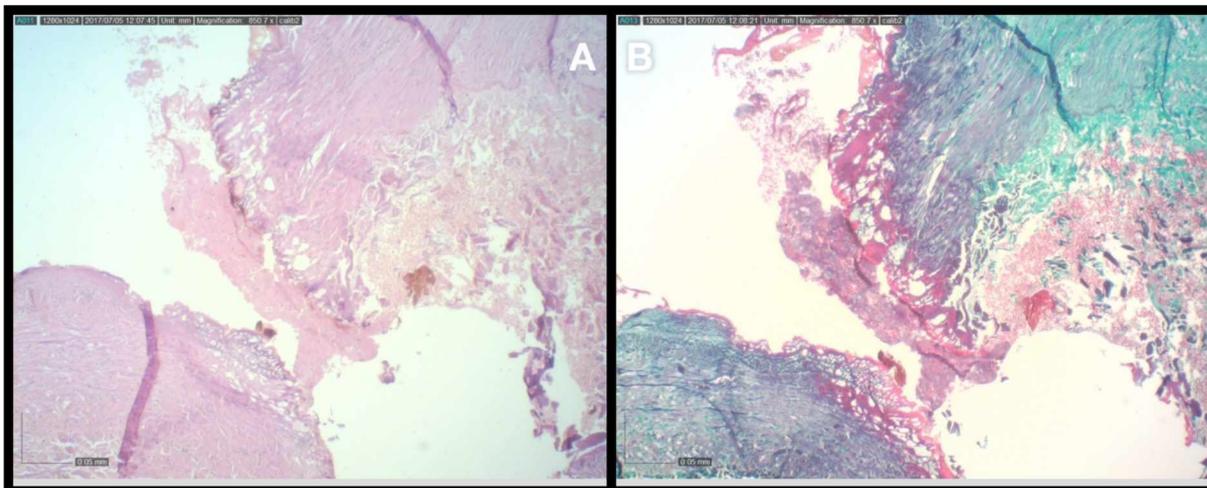
FONTE: O autor (2018).

FIGURA 15 - LESÃO POR TEMPERATURA ALTA (HTC) EVIDENCIADA NA COLORAÇÃO DE HEMATOXILINA E EOSINA - HE (A) E COLORAÇÃO DO TRICRÔMICO DE GOMORI (B), MOSTRANDO CARBONIZAÇÃO DA ÍNTIMA, VACUOLIZAÇÃO DA MÉDIA, EVIDENTE EOSINOFILIA E ALTERAÇÃO DA AFINIDADE TINTORIAL POR DESNATURAÇÃO DAS PROTEÍNAS



FONTE: O autor (2018).

FIGURA 16 - LESÃO POR TEMPERATURA MUITO ALTA (VHTCS), EVIDENCIADA NA COLORAÇÃO DE HEMATOXILINA E EOSINA - HE (A) E COLORAÇÃO DO TRICRÔMICO DE GOMORI (B), MOSTRANDO PERDA DE SUBSTÂNCIA (NESTE CASO DE ÍNTIMA, MÉDIA E ADVENTÍCIA, COM PERFURAÇÃO), ALÉM DE ALTERAÇÕES DE HTC E MTC NAS ADJACÊNCIAS



FONTE: O autor (2018).

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram analisados 208 fragmentos. As alterações previamente classificadas para a análise histológica e imuno-histoquímicas em 4 categorias (LTCs, MTCs, HTC's e VHTCs); foram reagrupadas para análise estatística em 2 categorias: lesões de baixo grau (LTCs + MTCs) e lesões de alto grau (HTCs + VHTCs) de acordo com a gravidade e considerando o fato de que a geração de temperaturas altas o suficiente para causar carbonização ou a ulceração (HTCs + VHTCs) é excessiva.

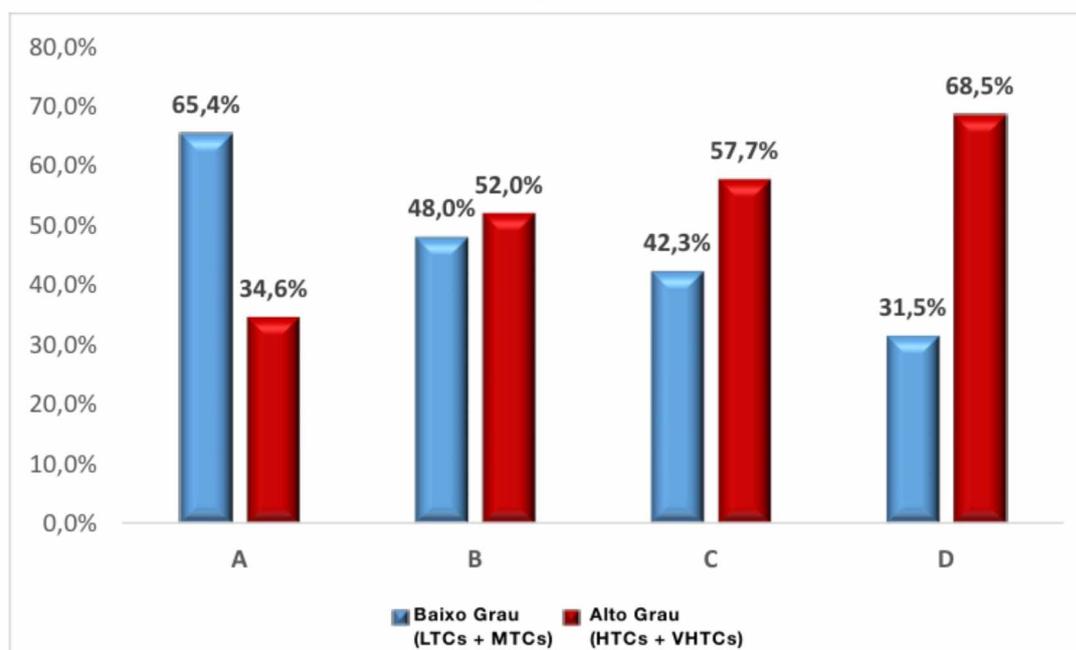
Em cada camada da parede vascular os grupos foram comparados dois a dois, testando-se a hipótese nula de probabilidade de lesão de alto grau igual, nos dois grupos sob comparação, versus a hipótese alternativa de probabilidades diferentes. Para tanto foi considerado o teste Exato de Fisher efetuando-se a correção de Bonferroni para o valor de p. O nível de significância global considerado em cada camada foi de 0,05, e devido a correção de Bonferroni valores de p menores do que 0,008 indicaram significância estatística. Os dados foram analisados com o programa computacional IBM SPSS Statistics v20.

4 RESULTADOS

4.1 CAMADA ÍNTIMA

Todos os 208 fragmentos (100%) apresentaram alguma alteração na camada íntima: 52 no grupo A (25,00%), 50 no grupo B (24,0%), 52 no grupo C (25,0%) e 54 no grupo D (26,0%). As alterações na camada íntima estratificadas pela intensidade da lesão térmica em baixo grau (LTCs + MTCs) vs. alto grau (HTCs + VHTCs), em cada grupo experimental estão expressos no GRÁFICO 1.

GRÁFICO 1 –GRAU DE ALTERAÇÃO DA CAMADA ÍNTIMA, DIVIDIDOS DE ACORDO COM A INTENSIDADE DA EXPOSIÇÃO TÉRMICA EM LESÕES DE BAIXO GRAU (LTCs + MTCs) E LESÕES DE ALTO GRAU (HTCs + VHTCs) EM CADA GRUPO



FONTE: O autor (2018).

Os grupos foram comparados dois a dois, testando-se a hipótese nula de probabilidade de lesão de alto grau (HTCs e VHTCs) igual nos dois grupos sob comparação versus a hipótese alternativa de probabilidades diferentes.

O grupo A foi o que apresentou a maioria das lesões de baixo grau na camada íntima (LTCs e MTCs) (65,4%) com diferença significativa quando comparado ao grupo D ($p < 0,001$). O grupo D foi o que apresentou a maioria das lesões de alto grau (HTCs e VHTCs) (68,5%) com diferença significativa quando foi comparado ao grupo

A ($p < 0,001$). Na TABELA 2 são apresentados os valores de p das comparações efetuadas.

TABELA 2 - VALORES DE P DOS TESTES ESTATÍSTICOS DA COMPARAÇÃO DOS GRUPOS DOIS A DOIS, PARA OS GRAUS DE ALTERAÇÃO DA CAMADA ÍNTIMA

Grupos sob comparação	Valor de p^*
A x B	0,109
A x C	0,030
A x D	0,001
B x C	0,691
B x D	0,109
C x D	0,314

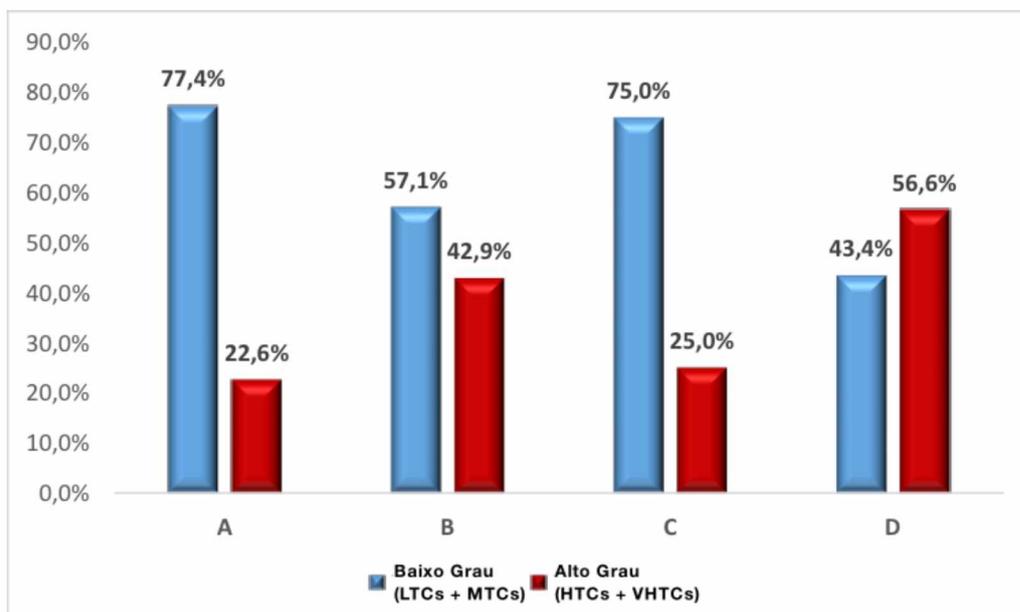
(*) Teste Exato de Fisher; valor de p corrigido pelo critério de Bonferroni; $p < 0,008$

FONTE: O autor (2018).

4.2 CAMADA MÉDIA

Um total de 207 fragmentos (99,51%) exibiu alguma alteração na camada média: 53 no grupo A (25,6%), 49 no grupo B (23,7%), 52 no grupo C (25,1%) e 53 no grupo D (25,6%). Essas alterações estão descritas no GRÁFICO 2.

GRÁFICO 2 –VARIAÇÃO DO GRAU DE ALTERAÇÃO DA CAMADA MÉDIA, DIVIDIDOS DE ACORDO COM A INTENSIDADE DA EXPOSIÇÃO TÉRMICA EM LESÕES DE BAIXO GRAU (LTCS + MTCS) E LESÕES DE ALTO GRAU (HTCS + VHTCS) EM CADA GRUPO



FONTE: O autor (2018).

Os grupos foram comparados dois a dois, testando-se a hipótese nula de probabilidade de lesão de alto grau (HTCs e VHTCs) igual nos dois grupos sob comparação versus a hipótese alternativa de probabilidades diferentes.

Os grupos A e C foram os que apresentaram a maioria das lesões de baixo grau (LTCS e MTCS) (77,4% e 75,0% respectivamente) na camada média sem diferença significativa entre eles. O grupo D foi o que apresentou a maioria das lesões de alto grau (HTCs e VHTCs) (56,6%) na camada média; com diferença significativa quando foi comparado ao grupo A ($p < 0,001$) e C ($p < 0,001$). Na TABELA 3 são apresentados os valores de p das comparações efetuadas.

TABELA 3 - VALORES DE P DOS TESTES ESTATÍSTICOS DA COMPARAÇÃO DOS GRUPOS DOIS A DOIS, PARA OS GRAUS DE ALTERAÇÃO DA CAMADA MÉDIA

Grupos sob comparação	Valor de p*
A x B	0,035
A x C	0,822
A x D	<0,001
B x C	0,063
B x D	0,234
C x D	0,001

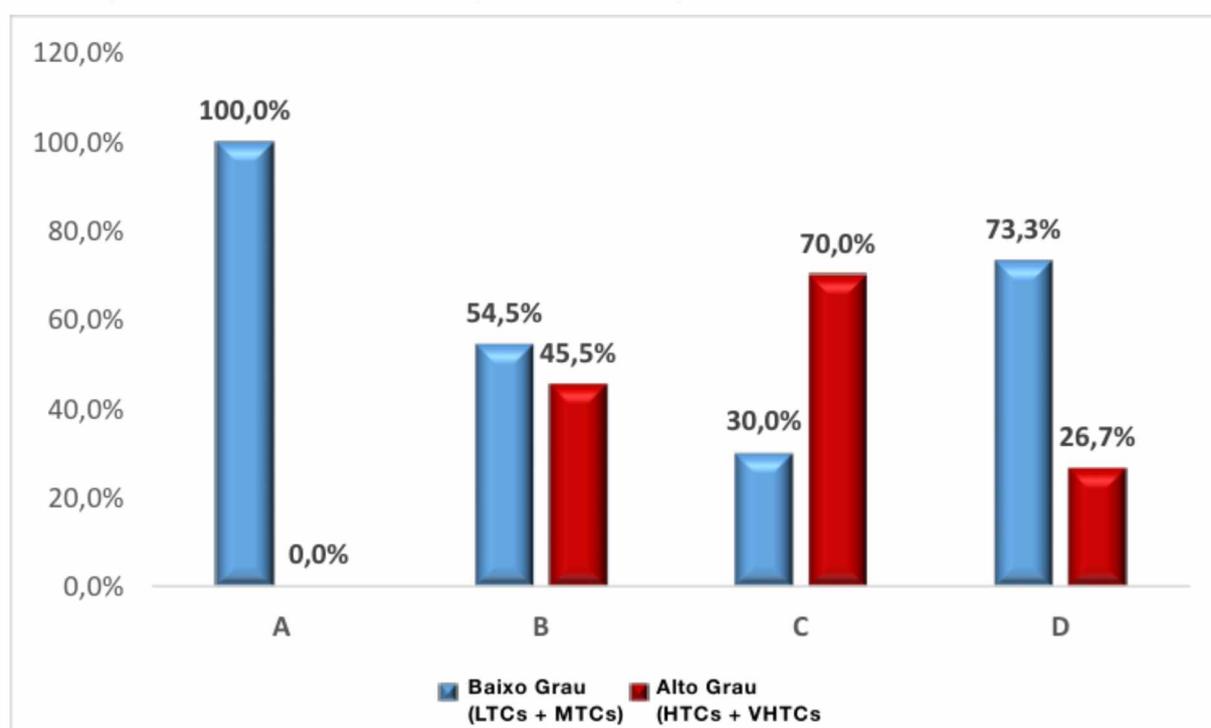
(*) Teste Exato de Fisher; valor de p corrigido pelo critério de Bonferroni; $p < 0,008$

FONTE: O autor (2018).

4.3 CAMADA ADVENTÍCIA

Um total de 65 fragmentos (31,25%) apresentou alguma alteração na camada adventícia: 14 no grupo A (21,5%), 11 no grupo B (16,9%), 10 no grupo C (15,4%) e 30 no grupo D (46,2 %). Essas alterações estão descritas no GRÁFICO 3.

GRÁFICO 3 –VARIAÇÃO DO GRAU DE ALTERAÇÃO DA CAMADA ADVENTÍCIA, DIVIDIDOS DE ACORDO COM A INTENSIDADE DA EXPOSIÇÃO TÉRMICA EM LESÕES DE BAIXO GRAU (LTCs + MTCs) E LESÕES DE ALTO GRAU (HTCs + VHTCs) EM CADA GRUPO



FONTE: O autor (2018).

Os grupos foram comparados dois a dois, testando-se a hipótese nula de probabilidade de lesão de alto grau (HTCs e VHTCs) igual nos dois grupos sob comparação versus a hipótese alternativa de probabilidades diferentes.

No grupo A 100 % das lesões foram de baixo grau (LTCs e MTCs). O grupo C foi o que apresentou a maioria das lesões de alto grau (HTCs e VHTCs), com diferença significativa quando comparada ao grupo A ($P < 0,001$). Na TABELA 4 são apresentados os valores de p das comparações efetuadas.

TABELA 4 - VALORES DE P DOS TESTES ESTATÍSTICOS DA COMPARAÇÃO DOS GRUPOS DOIS A DOIS, PARA OS GRAUS DE ALTERAÇÃO DA CAMADA ADVENTÍCIA

Grupos sob comparação	Valor de p*
A x B	0,009
A x C	<0,001
A x D	0,041
B x C	0,387
B x D	0,280
C x D	0,024

(*) Teste Exato de Fisher; valor de p corrigido pelo critério de Bonferroni; $p < 0,008$

FONTE: O autor (2018).

5 DISCUSSÃO

As Varizes de Membros inferiores são um problema médico comum. EVLA demonstrou ser um tratamento minimamente invasivo com resultados excelentes em termos de uma alta taxa de sucesso técnico e baixa taxa de complicação. (PROEBSTLE et al., 2003).

5.1 ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS APÓS A TERMOABLAÇÃO

O objetivo da EVLA é causar dano circunferencial irreversível à parede do vaso, evocando reações inflamatórias que incluem infiltração celular e reações fibrogênicas. Esses eventos inflamatórios levam a oclusão permanente da veia incompetente. A geração de temperaturas altas o suficiente para causar carbonização ou a ulceração é excessiva. A carbonização da parede da veia aumenta a probabilidade de perfuração assim como o aumento das intercorrências clínicas tais como dor pós-operatória, equimoses e recanalizações. (VUYLSTEKE et al., 2011).

Gaspar (2010) em seu estudo sobre os efeitos histológicos imediatos do endolaser na safena magna para tratamento da doença venosa crônica, evidenciou que a fototermólise produziu alterações histomorfológicas e histomorfométricas na parede da veia safena magna, predominantes na túnica íntima, sem maior penetração para a média ou adventícia; com exceção da concentração de colágeno que aumentou indistintamente nas três camadas, demonstrando elevado grau de segurança e eficácia do endolaser eco-guiado.

Corcos et al. (2005) avaliaram as alterações histológicas produzidas nas paredes dos vasos após irradiação por laser e descreveu as mudanças como necrose, vacuolização, delaminação, coagulação, perda de tecido e perfuração. Cada mudança reflete a temperatura específica alcançada durante o procedimento.

Yamamoto e Sakata (2014) simplificaram as alterações histológicas em LTCs, MTCs, HTC e VHTCs. A resposta celular do tecido biológico aquecido segue uma sequência de eventos bem descrita. Aquecimento prolongado em 42 °C a 45 °C resulta em danos reversíveis, subletais, que não podem ser observados microscopicamente. LTCs: Acima de 50 °C a 60°C, a proteína perde sua estrutura, resultando em necrose irreversível, desnaturação e coagulação de células. Microscópicamente podem ser vistos o edema das fibras musculares e elásticas.

MTCs: A fusão das células aumenta a temperaturas de 90 °C a 100 °C, causando a união de muitas fibras e perda dos seus componentes intracelulares. A água dos tecidos vaporiza, resultando em formação de vapor e dessecação do tecido. O encolhimento do tecido dessecado leva à formação de pequenas lacunas (vacuolos) entre as fibras. HTC: Compostos orgânicos aquecidos de 200 °C a 300 °C, sob condições deficientes de oxigênio, liberam nitrogênio, hidrogênio e outros componentes e começam a dissociar. VHTCs: O contato direto entre a ponta de fibra excessivamente quente e a parede do vaso levam a ulceração e perfuração da veia.

Veias submetidas ao procedimento de EVLA, quando retiradas imediatamente após o tratamento, mostram destruição irregular da parede da veia com perfurações e ulcerações devido ao contato direto entre a ponta da fibra e da parede da veia. O outro lado da veia não é danificado e permanece sem alterações. (SCHMEDT et al., 2006).

Veias retiradas após uma semana da realização de EVLA mostram tecido inflamatório celular na sua periferia com a formação de novos vasos pequenos e migração de fibroblastos e fagócitos. Estes infiltrados de tecido necro-inflamatórios ocorrem na parede da veia de fora para dentro. Grandes áreas da parede da veia são destruídas, e as células musculares ficam necrosadas, mas em uma distribuição desigual. Esta destruição é muito mais extensa do que nas amostras retiradas da veia imediatamente após o tratamento. Especialmente são vistas áreas de perfuração e destruição do tecido perivenoso. Nestes pontos, a organização e a migração de células são muito mais lentos e limitados. Ocorre também a carbonização no ponto de contato direto da fibra de laser com a parede da veia. (VUYLSTEKE et al., 2009).

Na análise das veias retiradas duas a três semanas após a realização de EVLA, a organização em torno das paredes se torna muito extensa. Infiltrados inflamatórios dissolvem o tecido destruído e ocorre a formação de tecido cicatricial. Numerosas citocinas e fatores de crescimento podem influenciar no nível de proliferação dos fibroblastos, bem como a sua transição para miofibroblastos. O trauma endoluminal e perivascular desestabilizam a estrutura em camadas da parede do vaso, provocando a ativação de fibroblastos adventíciais, conduzindo a migração celular. (BUSH; SHAMMA; HAMMOND, 2008).

5.2 COMPRIMENTOS DE ONDA

Os comprimentos de onda utilizados inicialmente no tratamento de insuficiência venosa estavam na extremidade inferior do espectro (810, 940, 980 e 1064 nm) e tinham a hemoglobina como alvo. Foram desenvolvidos aparelhos de laser com comprimento de onda maior (1320, 1470, 1940 nm) e que tem a água como alvo.

Tem sido discutido se esses sistemas produzem ação mais seletiva na parede da veia e menos ação indiretamente por bolhas de vapor, como demonstrado com os lasers de diodo de comprimento de onda 810-980 nm. (PROEBSTLE et al., 2002).

Resultados após EVLA com um laser de diodo de 1320 nm mostraram bons índices de obliteração e uma taxa menor de hematomas e dor. (GOLDMAN; MAURICIO; RAO, 2004).

Foi demonstrado que os pacientes tratados utilizando laser de diodo com comprimentos de onda maiores apresentaram maior conforto pós-operatório, melhor satisfação e aceitação do processo e relataram menos dor pós-operatória, usando menos analgésicos e foram menos propensos a ter equimoses. (DOGANCI; DEMIRKILIC, 2010).

A Utilização de lasers de comprimento de onda maiores (1320, 1470, 1500 nm) resulta em mais vacuolização da camada muscular da parede da veia resultando em uma intensa destruição térmica. (BUSH; SHAMMA; HAMMOND, 2008).

Vuylsteke et al. (2009) estudaram as diferenças na destruição da parede da veia produzidas por dois tipos de laser, os lasers de diodo de 980 e 1500 nm, durante o tratamento com laser endovenoso (EVLA) da veia safena em um modelo animal (cabras). Observaram que a energia fornecida a partir do laser de diodo 980 nm é menos absorvida pelas células da parede da veia e induz mais convecção local de energia térmica, explicando ulcerações mais profundas e carbonização mais intensa nos pontos de impacto direto do laser. Já o laser de 1500 nm proporcionou uma destruição menos excêntrica da parede da veia com ulcerações menos penetrantes; o que poderia se correlacionar clinicamente com a destruição de tecido menos perigosa e menor dor pós-operatória.

Sroka et al. (2012) estudaram inicialmente os efeitos histológicos do laser em modelo de pé de boi cheio de sangue. Utilizando um LEED de 30 J/cm evidenciaram, após uma análise histológica com HE, uma destruição circular da íntima e uma vacuolização e delaminação da camada média. Posteriormente realizaram um estudo

observacional, prospectivo utilizando um aparelho de laser com comprimento de onda de 1940nm, fibra radial e mecanismo de tração automática da fibra com velocidade padronizada de 1mm/s. Obtiveram uma eliminação do refluxo em 100% das veias safenas insuficientes bem como uma redução significativa do diâmetro das veias tratadas em 6 meses de acompanhamento. O perfil de risco se correlacionou com outras opções de tratamento endovenoso, com baixos índices de dor e de utilização de analgésicos no pós-operatório, indicando um alto nível de conforto do paciente. (SROKA et al., 2015).

Viarengo et al. fizeram uma análise retrospectiva de pacientes com insuficiência venosa crônica (CEAP) C2 a C6, submetidos a termoablação endovenosa de varizes tronculares, com laser com comprimento de onda de 1940 nm e LEED médio de 45,3 J/cm. Evidenciaram taxa de sucesso imediato de 100% e tardio de 95,1%. Não foi encontrado nenhuma recanalização nas veias tratadas com LEED superior a 30 J/cm. Os autores concluíram que o laser 1940 nm mostrou-se seguro e efetivo, em médio e longo prazo, para os parâmetros propostos, em segmentos venosos com até 10 mm de diâmetro. (VIARENGO et al., 2017).

No entanto Poluektova et al. (2013) em um estudo com modelo matemático sobre o tema demonstrou que, com a mesma quantidade de energia entregue, a temperatura da parede da veia seria maior com comprimentos de onda próximos a 1950 nm somente em calibres menores que 1mm. Nas outras situações, teoricamente teríamos que entregar maiores quantidades de energias para chegarmos à mesma temperatura atingida pelo comprimento de onda 1470 nm. Essa ocorrência foi justificada devido ao fato da alta absorção dos comprimentos de onda próximos a 1950 nm proporcionarem uma capacidade de penetração do calor reduzida. Ou seja, o calor ficaria “retido” muito próximo de onde é emitido. (POLUEKTOVA et al., 2013).

No presente estudo a termoablação com laser de comprimento de onda 1940 nm LEED de 100 J / cm resultou em uma taxa mais alta de lesão térmica de alto grau (HTCs e VHTCs) nas camadas íntima e média; sendo também o grupo com mais fragmentos (46,2%) evidenciando alterações na camada adventícia. Estes achados contrariam o modelo matemático proposto por Poluektova et al. 2013, evidenciando que os comprimentos de onda próximos ao 1950 nm (estudado por Poluektova et al. 2013) não proporcionaram no presente estudo uma capacidade de penetração reduzida, mesmo em veias de 3 a 10 mm, atingindo portanto com agressividade as

camadas íntima e média e sendo o grupo com mais alterações na camada adventícia; quando utilizado LEED de 100 J/cm.

5.3 DENSIDADE DE ENERGIA LINEAR ENDOVENOSA (LEED)

Timperman, Sichlau e Ryu (2004) realizaram um estudo com o uso de laser de comprimento de onda 810 e 940 nm e reportaram uma diferença significativa no fornecimento de energia do laser entre "sucesso" e "falhas" (63,4 J / cm contra 46,6 J / cm, $p < 0,0001$). Neste estudo, não houve falhas no tratamento com uma dose de laser > 80 J/cm embora em um estudo posterior do mesmo autor onde foram tratadas 100 veias safenas magnas com 95 J / cm, obteve-se uma termoablação bem sucedida em 95% dos membros. Além disso, eles concluíram que não houve diferença significativa entre os resultados em pacientes tratados com comprimentos de onda de laser diferentes.

Bueno et al. (2012), em um estudo de série de casos evidenciaram que a utilização do laser de 1.470 nm mostrou-se um bom método para tratamento das veias safenas, com resultados semelhantes ao laser de 980 nm e com uso de menores densidades de energia e menor potência.

Park et al. (2014), concluíram que o EVLA realizado com aparelho de laser 1470 nm e utilizando baixa energia, LEED de 80 J / cm ou inferior, é uma opção eficaz, segura, e tecnicamente bem-sucedida para o tratamento de veias safenas incompetentes.

Aktas et al. (2015), compararam a eficácia dos comprimentos de onda de 1470 e 980 nm no que diz respeito a potência de saída, complicações, taxas de recanalização e a resposta ao tratamento; tendo sido concluído que o laser de diodo e 1470 nm com fibra de ponta radial é seguro e eficaz para o EVLA. Uma energia menor (LEED de 50-60 J/cm) foi eficaz para a oclusão VSM e a resposta ao tratamento, avaliado pela melhora do escore de gravidade clínica, foi melhor com o laser de diodo com comprimento de onda de 1470 nm.

No presente estudo quando comparados os mesmos parâmetros de LEED (50 J/cm ou 100 J/cm) não houve diferença no comprimento de onda (1470 x 1940 nm) nas camadas íntima e média. Na camada adventícia e com LEED menor (50 J/cm) o

comprimento de onda 1470 nm mostrou-se superior para a presença de lesões de baixo grau (LTCs e MTCs).

5.4 TIPOS DE FIBRAS

Schmedt et al. (2006) estudaram os efeitos da fibra linear em um modelo ex-vivo que evidenciou que a utilização dessas fibras gera uma aplicação desigual de energia de luz fazendo-se necessário a utilização de uma maior energia para assegurar a destruição da parede da veia e evitar recanalizações. Por carbonização da parede da veia (contato direto) uma grande quantidade de energia é perdida e também aumenta a probabilidade de perfuração.

Kabnick (2012) em um estudo com um método in vitro para quantificar o potencial para a dor e hematomas por comparação do grau de perfuração de vasos no que diz respeito ao comprimento de onda e fibras; chegou a conclusão de que nenhum comprimento de onda foi superior quando comparado com o tipo de fibra utilizado. As fibras de ponta revestidas demonstraram um grau significativamente menor de perfuração em relação as fibras de ponta nua, tanto com os aparelhos de comprimento de onda de 810 ou 1470 nm. Conclui-se que as fibras de ponta revestidas são superiores em termos de recuperação, dor e hematomas pós-operatórios.

Hirokawa e Kurihara (2014), em seu estudo utilizando laser 1470 nm, obtiveram incidências de contusões e dor significativamente reduzidas pelo uso da fibra radial em comparação com a utilização da fibra linear, proporcionando um tratamento menos invasivo.

Yamamoto e Sakata (2014) estudaram a influência dos diferentes comprimentos de onda 980- 1470 nm e das fibras convencional, radial e dois anéis nas alterações histológicas da veia safena magna submetida a termoablação ex vivo. Concluíram que as fibras radiais e dois anéis combinadas com o laser de comprimento de onda 1470-nm podem aquecer e realizar a termoablação das paredes dos vasos de uma forma circunferencial e uniforme; sendo que a utilização da fibra de dois anéis proporciona uma maior uniformidade com uma incidência reduzida de aderência.

Portanto seguindo os melhores resultados da literatura; no presente estudo foi optado e utilizado a fibra de configuração radial.

5.5 TUMESCÊNCIA PERIVENOSA

A realização de tumescência perivenosa de grandes volumes de anestésico diluído sob a orientação de ultrassom vascular tem vários propósitos. Ela protege os tecidos perivasculares dos efeitos térmicos, servindo como um dissipador de calor e também diminui o diâmetro da veia tratada para permitir uma melhor absorção da energia pelo cromóforo alvo na parede da veia. (MEMETOGLU, et al., 2010).

Outra questão a ser considerada é que examinando a localização da fibra no controle com ultrassom intraoperatório, fica evidente que a ponta da fibra, na maioria dos procedimentos, encontra-se situada em uma posição excêntrica com a ponta tocando a parede da veia. A realização da tumescência perivenosa tem, portanto também como um dos objetivos induzir espasmo da veia em torno da fibra, podendo diminuir este efeito.

Mas, mesmo assim, especialmente em veias maiores, a ponta da fibra permanece excêntrica; principalmente quando se trata da fibra convencional. Em tal situação, quando a energia é fornecida a partir da ponta da fibra, ocorre um contato direto entre a ponta da fibra e a parede da veia resultando em uma desigual aplicação de energia gerando ulceração ou até uma perfuração da veia. Estas perfurações provocam também posteriormente o aparecimento de equimoses; além de aumentar a possibilidade de recanalização da veia tratada devido a uma destruição circunferencial incompleta das estruturas da parede do vaso, permitindo sua regeneração.

Dumantepe e Uyar (2015) desenvolveram um estudo com o objetivo de comparar a percepção da dor e efeitos colaterais durante e após a EVLA com um laser de diodo 1470 nm usando anestesia tumescence com temperatura fria ou temperatura ambiente e concluiu que o líquido tumescente frio é mais seguro do que à temperatura ambiente e produz melhores escores de dor na escala visual analógica.

No presente estudo o modelo experimental utilizado simulava os efeitos fisiológicos da realização da tumescência fazendo a função de dissipar calor e também diminuindo o diâmetro da veia tratada permitindo uma melhor absorção da energia na parede da veia através do seu cromóforo alvo.

5.6 DIÂMETROS DA VEIA SAFENA MAGNA

Proebstle et al. (2004) concluíram que a fluência do laser (energia do laser por cm^2 de veia) foi um fator de risco para a não obliteração e que os regimes de tratamento devem basear-se neste tipo de cálculo.

Proebstle, Moehler e Herdemann (2006), utilizando um laser de comprimento de onda 940 nm, produziram dados que sugerem que o fornecimento de energia necessária para alcançar a termoablação da VSM e baixas taxas de recanalização é dependente não só da quantidade de energia fornecida, mas também do diâmetro da veia. Neste trabalho concluiu-se que 6,3 J / cm de energia foram necessários para cada 1 mm de diâmetro da VSM para que a termoablação fosse eficaz. Assim, para uma veia 10 mm de diâmetro seria o equivalente a 63 J / cm.

Corcos et al. (2005) estudando as alterações morfológicas venosas imediatas produzidas na VSM pelo laser de diodo endovenoso de 808 nm concluíram que um tempo de exposição mais curto, obtido principalmente através do aumento da velocidade de retração da fibra (1 milímetro m/s), é recomendável em segmentos da VSM até 10 mm de diâmetro. Um tempo de exposição mais longa, obtido por uma lenta retração da fibra pode ser utilizado com sucesso em segmentos maiores de 17 mm de diâmetro

Starodubtsev et al. (2014), em um estudo para avaliar a segurança e eficácia do uso do comprimento de onda do laser 1560 nm, para tratamento da doença venosa crônica em pacientes com diâmetros aumentados do segmento proximal da veia safena magna, mostraram a segurança e eficácia da técnica e evidenciaram que a realização do EVLA tem de ser personalizada de acordo com o diâmetro da veia.

Tal argumento pode ser falho, já que o diâmetro da veia no momento da ablação é significativamente reduzido devido ao espasmo induzido após a cateterização, juntamente com o efeito da infiltração de líquido tumescente. Além disso, a veia pode não ter um diâmetro uniforme em todo o seu comprimento fazendo com que o cálculo fique ainda mais difícil.

Florescu, Curry e Buckenham (2014), avaliaram a eficácia da terapia laser endovenoso na ablação da VSM com um diâmetro superior a 1,0 cm e concluíram que a ablação para VSM grandes ($\geq 1,0$ cm e muito grandes $\geq 2,0$ cm) não diferiram de uma coorte de pacientes com VSM $< 1,0$ cm e de resultados publicados para VSMs $<$

1,0 cm. A ablação com sucesso foi alcançada em 100% das veias independentes do tamanho durante o seguimento de 6 semanas.

Neste estudo foram tratadas veias de calibres entre 3 a 10 mm não permitindo, portanto, uma projeção de resultados principalmente com relação a veias de calibres maiores do que 10 mm.

5.7 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Embora essas experiências ex vivo pareçam promissoras elas possuem algumas limitações como: o segmento de veia pode sofrer algumas alterações durante a sua retirada; a possibilidade de análise apenas dos efeitos imediatos do tratamento e a impossibilidade do estudo do tecido perivascular.

Neste estudo foram tratadas veias de calibres entre 3 a 10 mm não permitindo, portanto, uma projeção de resultados principalmente quanto a veias de calibres menores que 3 mm ou maiores do que 10 mm.

Foram utilizados neste trabalho LEEDs de 50 J/cm e 100 J/cm não permitindo avaliar nesse estudo os resultados específicos do comprimento de onda 1940 nm, em relação aos seus antecessores, se for considerado a utilização de LEEDs inferiores a 50 J/cm.

6 CONCLUSÕES

Neste trabalho foi possível concluir que:

1. O laser de comprimento de onda 1470 nm e LEED 50 J/cm provocou mais lesões de baixo grau (LTCs e MTCs) em todas as camadas (íntima, média e adventícia).
2. O laser de comprimento de onda 1940 nm e LEED 100 J/cm provocou mais lesões de alto grau (HTCs e VHTCs) nas camadas íntima e média; e foi o grupo mais predominante (46,2%) dentre o total de fragmentos que mostraram alguma alteração na camada adventícia.
3. Nas camadas íntima e média a comparação dos dois comprimentos de onda (1470 nm x 1940 nm) para o mesmo parâmetro de LEED (50 J/cm ou 100 J/cm) não apresentou diferença significativa.
4. Na camada adventícia a comparação dos dois comprimentos de onda (1470nm x 1940 nm) para o mesmo LEED 50 J/cm mostrou uma superioridade do comprimento de onda 1470 nm para a presença de lesões de baixo grau (LTCs e MTCs).
5. Esses achados corroboram a possibilidade de se utilizar LEEDs mais baixos com dispositivos de 1940 nm para se conseguir oclusão efetiva com menos destruição de alto grau da camada íntima e média; bem como prevenir danos na camada adventícia, perfurações e suas possíveis alterações no tecido perivenoso e consequências clínicas.

REFERÊNCIAS

- AKTAS, A. R. et al. Comparing 1470- and 980-nm diode lasers for endovenous ablation treatments. **Lasers Med. Sci.**, London, v. 30, p. 1583-1587, 2015.
- AMZAYYB, M. et al. Carbonized blood deposited on fibers during 810, 940 and 1,470 nm endovenous laser ablation: thickness and absorption by optical coherence tomography. **Lasers Med. Sci.**, London, v. 25, p. 439-447, 2010.
- ARAUJO, W. J. et al. Development of an ex vivo model of endovenous laser ablation of the great saphenous vein in a pilot study. **Acta Cir. Bras.**, São Paulo, v. 31, p. 161-167, 2016.
- AVWIORO, O. G. **Histochemistry and tissue pathology, principles and techniques**. Ibadan: Claverianum Press, 2010.
- BEALE, R. J.; GOUGH, M. J. Treatment options for primary varicose veins - a review. **Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.**, London, v. 30, p. 83-95, 2005.
- BUENO, K. S. et al. Endolaser venoso: estudo série de casos. **J. Vasc. Bras.**, Rio de Janeiro, v.11, p. 286-288, 2012.
- BUSH, R. G.; SHAMMA, H. N.; HAMMOND, K. Histological changes occurring after endoluminal ablation with two diode lasers (940 and 1,319 nm) from acute changes to 4 months. **Lasers Med. Sci.**, London, v. 40, p. 676-679, 2008.
- CARVALHO, J. J. et al. Estudo histoquímico das fibras dos sistema elástico e da proteoglicanas da parede de veias safenadas normais e alteradas. **Cir. Vasc. Angiol.**, São Paulo, v. 4, p. 7-12, 1988.
- CORCOS, L. et al. Immediate effects of endovenous diode 808 nm laser in the greater saphenous vein: morphologic study and clinical implications. **J. Vasc. Surg.**, St. Louis, v. 41, p. 1018-1024, 2005.
- CORMACK, D. H. O Sistema circulatório. In: **Ham Histologia**. 9. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1991. p. 331-351.
- DISSELHOFF, B. C. V. M. et al. Endovenous laser ablation: an experimental study on the mechanism of action. **Phlebology**, London, v. 23, p. 69-76, 2008.
- DOGANCI, S.; DEMIRKILIC, U. Comparison of 980 nm laser and bare-tip fiber with 1470 nm laser and radial fiber in the treatment of great saphenous vein varicosities: a prospective randomized clinical trial. **Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.**, London, v.40, p. 254-259, 2010.
- DUMANTEPE, M.; UYAR, I. Comparing cold and warm tumescent anesthesia for pain perception during and after the endovenous laser ablation procedure with 1470 nm

diode laser. **Phlebology**, London, v. 30, p. 45-51, 2015.

FAN, C. M.; ROX-ANDERSON, R. Endovenous laser ablation: mechanism of action. **Phlebology**, London, v.23, p.206-213, 2008.

FLORESCU, C.; CURRY, G.; BUCKENHAM, T. Role of endovenous laser therapy in large and very large diameter great saphenous veins. **ANZ J Surg.**, Carlton, v. 86, p. 608-611 2014. doi: 10.1111/ans.12672.

GASPAR, R. J. **Efeitos do endolaser na safena magna para tratamento da doença venosa crônica**. Tese (Doutorado) - Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2010.

GOLDMAN, M. P.; MAURICIO, M.; RAO, J. Intravascular 1320-nm laser closure of the great saphenous vein: a 6-to 12-month follow-up study. **Dermatol. Surg.**, New York, v.30, p.1380-1385, 2004.

GOMORI, G. A rapid one-step trichrome stain. **Am. J. Clin. Pathol.**, Baltimore, v. 20, n. 7, p. 661, 1950.

HALE, G. M.; QUERRY, MR. Optical constants of water in the 200-nm to 200- μ m wavelength region. **Applied optics**, v. 12, n. 3, p. 555-563, 1973.

HECHT, J. **Understanding lasers: an entry-level guide**. 3. ed. Piscataway, New Jersey: IEEE Press, 2008.

HEGER, M. et al. Endovascular laser–tissue interactions and biological responses in relation to endovenous laser therapy. **Lasers Med. Sci.**, London, v. 29, p. 405-422, 2014.

HIROKAWA, M.; KURIHARA, N. Comparison of bare-tip and radial fiber in endovenous laser ablation with 1470 nm diode laser. **Ann. Vasc. Dis.**, Detroit, v.7, p.239–245, 2014.

KABNICK, L. S. K. Which is more important for postoperative recovery: laser wavelength or fibers? **J. Vasc. Surg.**, St. Louis, v. 55, p. 307, 2012.

KAPLAN, R. M. et al. Quality of life in patients with chronic venous disease: San Diego population study. **J. Vasc. Surg.**, St. Louis, v. 37, p. 1047-1053, 2003.

MALSKAT, W. S. J. et al. Endovenous laser ablation (EVLA): review of mechanisms, modeling outcomes and issues for debate. **Lasers Med. Sci.**, London, v. 29, p. 393-403, 2014.

MEISSNER, O. A. et al. Endovascular optical coherence tomography ex vivo: venous wall anatomy and tissue alterations after endovenous therapy. **Histochem. J.**, London, v. 17 p. 2384-2393, 2007.

MEMETOGLU, M. E. et al. Combination technique of tumescent anesthesia during endovenous laser therapy of saphenous vein insufficiency. **Interact. Cardiovasc.**

Thorac. Surg., Amsterdam, v. 11, p. 774-777, 2010.

MIN, R. J.; KHILNANI, N.; ZIMMET, S. E. Endovenous laser treatment of saphenous vein reflux: long-term results. **J. Vasc. Interv. Radiol.**, Reston, v. 14, p. 991-996, 2003.

MUNDY, L. et al. Systematic review of endovenous laser treatment for varicose veins. **Br. J. Surg.**, Bristol, v. 92, p. 1189-1194, 2005.

NEUMANN, H. M.; VAN GEMERT, M. J. Ins and outs of endovenous laser ablation: afterthoughts. **Lasers Med. Sci.**, London, v. 29, p. 513-518, 2014.

PARK, J. A. et al. The 1470-nm bare-fiber diode laser ablation of the great saphenous vein and small saphenous vein at 1-year follow-up using 8-12 W and a mean linear endovenous energy density of 72 J/cm. **J. Vasc. Interv. Radiol.**, Reston, v.25, p.1795-1800, 2014.

POLUEKTOVA, A. A et al. Some controversies in endovenous laser ablation of varicose veins addressed by optical-thermal mathematical modeling. **Lasers Med. Sci.**, London, v. 29, p.441-452, 2014.

PROEBSTLE, T. M. et al. Endovenous treatment of the greater saphenous vein with a 940-nm diode laser: thrombotic occlusion after endoluminal thermal damage by laser-generated steam bubbles. **J. Vasc. Surg.**, St. Louis, v.35, p.729-736, 2002.

PROEBSTLE, T. M. et al. Infrequent early recanalization of greater saphenous vein after endovenous laser treatment. **J. Vasc. Surg.**, St. Louis, v.38, p.511-516, 2003.

PROEBSTLE, T. M. et al. Non-occlusion and early reopening of the great saphenous vein after endovenous laser treatment is fluence dependent. **Dermatol. Surg.**, New York, v. 30, p.174-178, 2004.

PROEBSTLE, T. M.; MOEHLER, T.; HERDEMANN, S. Reduced recanalization rates of the great saphenous vein after endovenous laser treatment with increased energy dosing: definition of a threshold for the endovenous fluence equivalent. **Vasc. Surg.**, New York, v. 44, p. 834-839, 2006.

RHODIN, J. A. G. Architecture of the vessel wall. In: BOHR, D. F.; SOMLYO, A. A.; SPARKS, H. V. (Ed.). **Handbook of physiology**. Section 2: The Cardiovascular System, Bethesda: American Physiological Society, 1980. p. 1-31.

SCHILDMEYER, L. A. et al. Impaired vascular contractility and blood pressure homeostasis in the smooth muscle α -actin null mouse. **FASEB Journal**, Bethesda, v. 14, n. 14, p. 2213-2220, 2000.

SCHMEDT, C.G. et al. Investigation on radiofrequency and laser (980 nm) effects after endoluminal treatment of saphenous vein insufficiency in an ex-vivo model. **Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.**, London, v.32, p.318-325, 2006.

SIEGMAN, A.E. **Lasers**. Sausalito, California University: Science Books, 1986.

SILVEIRA, P. R. M.; PORTO, L. C. M. S. Parede venosa: uma visão atualizada de sua estrutura microscópica. **Cir. Vasc. Angiol.**, São Paulo, v. 9, n. 3, p. 12-17, 1993.

SIMIONESCU, N.; SIMIONESCU, M. Histology cell and tissue biology. Histology cell and tissue biology. Elsevier Biomedical, New York, 1983.

SMITH, J. J. et al. Measuring the quality of life in patients with venous ulcers. **J. Vasc. Surg.**, St. Louis, v. 31, p. 642-649, 2000.

SROKA, R. et al. The ox-foot-model for investigating endoluminal thermal treatment modalities of varicosis vein diseases. **ALTEX.**, Heidelberg, v. 29, p. 403-410, 2012. doi: 10.14573/altex.2012.4.403.

SROKA, R. et al. Endovenous laser therapy for occlusion of incompetent saphenous veins using 1940nm. Proc. SPIE 9542, Medical Laser Applications and Laser-Tissue Interactions VII, 95420D (July 15, 2015); doi:10.1117/12.2183777.

STARODUBTSEV, V. et al. Endovenous laser ablation in patients with wide diameter of the proximal segment of the great saphenous vein: comparison of methods. **Phlebology**, London, v. 30, p. 700-705, 2015. doi:10.1177/0268355514555546.

TIMPERMAN, P. E.; SICHLAU, M.; RYU, R. K. Greater energy delivery improves treatment success of endovenous laser treatment of incompetent saphenous veins. **J. Vasc. Interv. Radiol.**, Reston, v. 15, p. 1061-1063, 2004.

VAN DEN BOS, R. et al. Technical review of endovenous laser therapy for varicose veins. **Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.**, London, v.35, p.88-95, 2008.

VAN DEN BOS, R. R. et al. Heat conduction from the exceedingly hot fiber tip contributes to the endovenous laser ablation of varicose veins. **Lasers Med. Sci.**, London, v. 24, p. 247-251, 2009.

VERDAASDONK, R. M. et al. Temperature along the surface of modified fiber tips for Nd:YAG laser angioplasty. **Lasers Med. Sci.**, London, v. 11, p. 213-222, 1991.

VIARENGO, L. M. A. et al. Resultados de médio e longo prazo do tratamento endovenoso de varizes com laser de diodo em 1940 nm: análise crítica e considerações técnicas. **J. Vasc. Bras.** Rio de Janeiro, v. 16, p. 23-30, 2017.

VUYLSTEKE, M. E. et al. Endovenous laser treatment of saphenous vein reflux: how much energy do we need to prevent recanalizations? **Vasc. Endovasc. Surg.**, London, v.42, p. 141-149, 2008.

VUYLSTEKE, M. E. et al. Endovenous laser treatment: a morphological study in an animal model. **Phlebology**, London, v.24, p.166-175, 2009.

VUYLSTEKE, M. E. et al. Endovenous laser ablation: the role of the intraluminal blood. **Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.**, London, v.42, p.120-126, 2011.

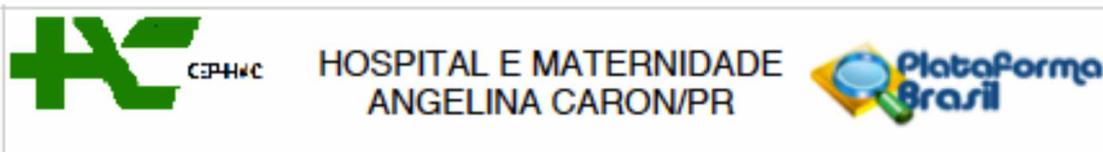
VUYLSTEKE, M. E. et al. Endovenous laser ablation: a review of mechanisms of action. **Annals of Vascular Surgery**, v. 26, n. 3, p. 424-433, 2012.

YAMAMOTO, T.; SAKATA, M. Influence of fibers and wavelengths on the mechanism of action of endovenous laser ablation. **J. Vasc. Surg. Venous Lymphat. Dis.**, v. 2, p. 61-69, 2014.

YU D.Y. et al. Comparing the effectiveness of 1064 vs. 810 nm wavelength endovascular laser for chronic venous insufficiency (varicose veins). **Laser Ther.**, v. 22, p. 247-253, 2013.

ANEXO

ANEXO 1 - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ANÁLISE HISTOLÓGICA DA VEIA SAFENA MAGNA SUBMETIDA A TERMOABLAÇÃO COM LASER EM MODELO EX VIVO, UTILIZANDO DIFERENTES COMPRIMENTOS DE ONDA, POTÊNCIAS, VELOCIDADES DE TRAÇÃO E TIPOS

Pesquisador: Walter Junior Boim de Araujo

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 45209015.9.0000.5226

Instituição Proponente: Hospital e Maternidade Angelina Caron / PR

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.088.788

Data da Relatoria: 22/05/2015

Apresentação do Projeto:

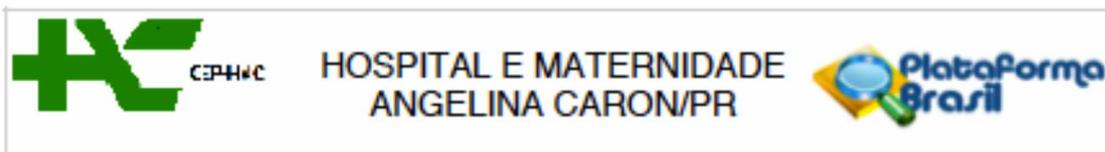
As varizes de membros inferiores tem sido considerado um problema estético que afeta o emocional e também como uma fonte de incapacidade. São frequentemente causa de desconforto, dor, afastamento do trabalho e deterioração da qualidade de vida.

A abordagem padrão para o tratamento cirúrgico da insuficiência venosa da veia safena com ligadura cirúrgica e fleboextração tem sido substituída, em pacientes apropriados, por técnicas menos invasivas tais como escleroterapia, radiofrequência, ou termoablação por laser endovenoso – EVLA.

O mecanismo de ação da termoablação com laser endovenoso (EVLA) no tratamento de varizes é baseada na geração de calor levando a dano endotelial, resultando assim no espessamento e fibrose com oclusão não-trombótica das veias incompetentes.

A intensidade de contração da parede venosa parece ser importante, pois o lúmen residual da veia após o tratamento com laser é sujeito a oclusão pela formação de coágulos. Este coágulo posteriormente pode sofrer o processo de recanalização. Nestes casos, a irradiação com laser não é suficiente para aquecer a parede do vaso, porque a energia de luz é quase inteiramente absorvida pelo sangue, e a taxa de sucesso inicial é principalmente devido a um efeito trombótico que após a dissolução do trombo leva a uma recanalização da veia.

Endereço: Rod. do Caqui nº 1150 km 01- Caixa Postal 046
Bairro: Jardim Araçatuba **CEP:** 83.430-000
UF: PR **Município:** CAMPINA GRANDE DO SUL
Telefone: (41)3679-8100 **Fax:** (41)3679-8100 **E-mail:** cephac@hospitalcaron.com.br



Continuação do Parecer: 1.088.788

Os critérios de inclusão serão pacientes entre 18 e 70 anos de ambos os sexos, submetidos previamente ao exame de ecodoppler vascular com indicação de safenectomia através da técnica de fleboextração por eversão, cujas medidas de diâmetros da veia safena magna estão compreendidas entre 3 mm e 10 mm e que concordarem em participar do estudo assinando o termo de consentimento.

Os critérios de exclusão serão pacientes cujos diâmetros pré-operatórios da veia safena magna são menores que 3 mm e/ou maiores que 10 mm ou que não concordarem em participar do estudo e/ou não assinarem o termo de consentimento.

Para obtenção da veia safena magna para realização desse estudo, os pacientes já programados para tratamento cirúrgico de varizes convencional assinarão termo de consentimento autorizando a utilização ex vivo da veia que será removida através de fleboextração por eversão. Assim como autorizarão a coleta de 20 ml de sangue para posterior utilização no modelo ex vivo da pesquisa.

As veias obtidas serão seccionadas em segmentos de cerca de 20 cm de comprimento. Para a realização do procedimento de termoablação ex vivo será utilizado o modelo experimental descrito por Yamamoto and Sakata⁸, composto de tubos de acrílico, tampões de borracha, agulhas de injeção, e bainhas 7F. Esse modelo experimental permitirá a reprodução das condições fisiológicas da veia safena magna durante a realização da termoablação.

O segmento de veia safena magna obtido será esticado e amarrado nas duas extremidades da bainha, posteriormente o tubo vai ser preenchido com soro fisiológico em temperatura ambiente e o sangue humano com anticoagulante EDTA será injetado para preenchimento do segmento da veia safena magna.

A termoablação e a tração da fibra vão ser iniciados simultaneamente e as veias safenas magnas serão irradiadas ao longo de um comprimento de aproximadamente 18 cm.

Serão utilizados aparelhos de laser com diferentes comprimentos de onda, potências e densidade de energia linear endovenosa média (J/cm) – LEED, diferentes características das fibras; bem como o sistema de tração automática da fibra será ajustado para deslocar a fibra em diferentes velocidades.

Dez segmentos de VSM serão submetidos a termoablação em cada configuração. A presença ou ausência de aderências entre as fibras e as paredes das veias (degola) será registrada. Imediatamente após a irradiação, cada VSM será removida e aberta longitudinalmente. A circunferência do segmento irradiado (A) vai ser medida, assim como a circunferência de um segmento suficientemente distante do segmento irradiado para ser considerado como não irradiado (B). A relação de encolhimento será calculada utilizando a fórmula $1 - (A / B)$.

Endereço: Rod. do Caqui nº 1150 km 01- Caixa Postal 046
 Bairro: Jardim Araçatuba CEP: 83.430-000
 UF: PR Município: CAMPINA GRANDE DO SUL
 Telefone: (41)3679-8100 Fax: (41)3679-8100 E-mail: caphac@hospitalcaron.com.br



Continuação do Parecer: 1.068.788

Os segmentos de VSM submetidas a termoablação vão ser fixados em formalina a 10% e cortadas transversalmente. Os cortes serão corados com um azan trichrome stain antes de ser apresentados para análise histológica.

As alterações histológicas serão classificadas em 4 grupos: alterações de baixa temperatura (LTCs), indicadas por edema do músculo liso ou fibras elásticas; alterações de media temperatura (MTCs), incluindo a fusão ou vacuolização das fibras elásticas; alterações de alta temperatura (HTCs), incluindo carbonização do tecido e alterações de muito alta temperatura (VHTCs), caracterizada pela perda de tecido.

Três pontos de medição serão escolhidos em cada segmento de veia submetida a termoablação, o primeiro ponto vai ser fixado no centro da veia seccionada e o segundo e terceiro pontos equidistantes nas bordas em ambos os lados. As médias dos valores medidos serão calculados a partir dos três pontos nos vasos irradiados.

Análise de variância e o método de Tukey serão utilizados para comparar a relação de encolhimento entre os diferentes níveis de potência e velocidades de tração da fibra em cada ambiente, e o teste t de Student será utilizado para comparar a relação de encolhimento entre os dois comprimentos de onda.

Os cálculos estatísticos vão ser realizados na planilha eletrônica (Microsoft Excel 2011).

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar as alterações histológicas da veia safena magna submetida a termoablação com laser em modelo ex vivo, utilizando diferentes comprimentos de onda, potências, velocidades de tração e tipos de fibras.

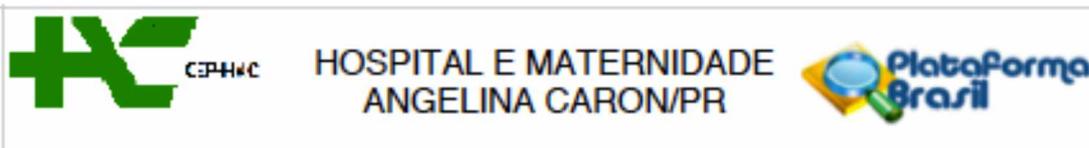
Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os resultados desse estudo ajudarão para que aumentem os conhecimentos sobre os importantes fatores que influenciam nos parâmetros utilizado no procedimento de termoablação com o laser endovenoso, melhorando desta forma os resultados dos pacientes tratados por esta técnica.

A simples doação voluntária da veia safena magna que vai ser retirada devido ao problema de varizes, não acarretará em nenhum dano, considerando também que ela será avaliada posteriormente em laboratório e que rotineiramente seria descartada após a cirurgia.

A coleta de sangue (20 ml) não oferece riscos previsíveis.

Endereço: Rod. do Caqui nº 1150 km 01- Caixa Postal 046
 Bairro: Jardim Araçatuba CEP: 83.430-000
 UF: PR Município: CAMPINA GRANDE DO SUL
 Telefone: (41)3679-8100 Fax: (41)3679-8100 E-mail: cephac@hospitalcaron.com.br



Continuação do Parecer: 1.066.788

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O protocolo possui estrutura adequada às resoluções da CNS 466/12, contém todos os documentos exigidos, a organização dos documentos é adequada em sua seqüência e apresentação, foi fornecida cópia digital de todos os documentos que permita copiar/colar.

A Folha de Rosto foi preenchida corretamente,

O projeto, possui exequibilidade na proposta, clareza dos objetivos, a compatibilidade entre objetivos e resultados esperados, a fundamentação teórica e metodológica, a descrição dos procedimentos que serão realizados, a apresentação de benefícios e riscos, a presença de retorno de benefícios para o sujeito e a comunidade.

A tabela para coleta de dados, é bem estruturada e possui clareza que vai garantir a coleta adequada dos dados.

O Cronograma de Execução, tem prazos para cada fase adequados à evolução e cumprimento do projeto.

O Orçamento é adequado para suprir as necessidades financeiras do projeto.

O TCLE apresenta-se em conformidade às resoluções CNS 196/96 e CONEP 251/97, contendo as informações necessárias e utilizando-se de linguagem adequada para o bom entendimento por parte de qualquer nível sócio-cultural que os pacientes possam apresentar.

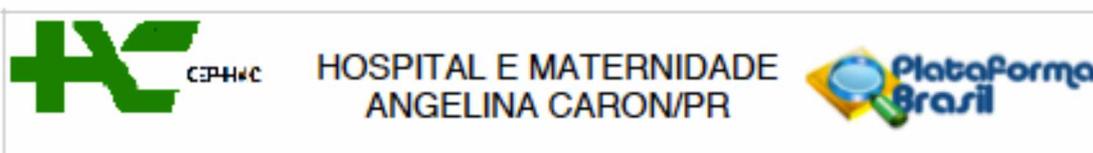
A instituição Sociedade Hospitalar Angelina Caron onde será realizado o projeto, está comprometida com o projeto e tem capacidade em executá-lo.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Carta datada de 18 de maio de 2015, encaminhando ao CEP para análise os seguintes documentos:

- Folha de rosto
- Projeto de pesquisa em português
- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)
- Curriculum Vitae dos pesquisadores e identificação na Plataforma Lattes
- Instrumento para coleta de dados
- Cronograma de execução
- Orçamento
- Cópia digital que permita "copiar/colar" de todos os documentos
- Declaração do orientador afirmando ter lido e revisado todo o protocolo e assumindo a co-responsabilidade pela documentação em sua forma e conteúdo.

Endereço: Rod. do Caqui nº 1150 km 01- Caixa Postal 046
 Bairro: Jardim Araçatuba CEP: 83.430-000
 UF: PR Município: CAMPINA GRANDE DO SUL
 Telefone: (41)3679-8100 Fax: (41)3679-8100 E-mail: cepnac@hospitalcaron.com.br



Continuação do Parecer: 1.088.788

Recomendações:

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Angelina Caron – CEP-HAC, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/12, manifesta-se pela **APROVAÇÃO** com recomendações do projeto de pesquisa. "ANÁLISE HISTOLÓGICA DA VEIA SAFENA MAGNA SUBMETIDA A TERMOABLAÇÃO COM LASER EM MODELO EX VIVO, UTILIZANDO DIFERENTES COMPRIMENTOS DE ONDA, POTÊNCIAS, VELOCIDADES DE TRAÇÃO E TIPOS DE FIBRAS", nos termos em que está proposto.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não foram detectadas falhas metodológicas ou éticas, não havendo, portanto, pendências no referido projeto.

Porém recomendamos que não se utilize de frases como "Os resultados desse estudo ajudarão para que aumentem os conhecimentos sobre os importantes fatores que influenciam nos parâmetros utilizado no procedimento de termoablação com o laser endovenoso, melhorando desta forma os resultados dos pacientes tratados por esta técnica." Pois como se trata de um estudo que ainda não foi realizado, não é possível prometer como resultado o aumento de conhecimento em relação ao tema proposto.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

CAMPINA GRANDE DO SUL, 01 de Junho de 2015

**Assinado por:
Fabio Okipney
(Coordenador)**

Endereço: Rod. do Caqui nº 1150 km 01- Caixa Postal 046
 Bairro: Jardim Araçatuba CEP: 83.430-000
 UF: PR Município: CAMPINA GRANDE DO SUL
 Telefone: (41)3679-8100 Fax: (41)3679-8100 E-mail: cephac@hospitalcaron.com.br

ANEXO 2 – TERMO DE CONSENTIMENTO

TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do Projeto: ANÁLISE HISTOLÓGICA DA VEIA SAFENA MAGNA SUBMETIDA A TERMOABLAÇÃO COM LASER EM MODELO EX VIVO, UTILIZANDO DIFERENTES COMPRIMENTOS DE ONDA, POTÊNCIAS, VELOCIDADES DE TRAÇÃO E TIPOS DE FIBRAS.

Investigador: Walter Junior Boim de Araujo

Local da Pesquisa: Hospital Angelina Caron

Endereço e telefone: Rodovia do Caqui, 1150 - Recanto Verde, Araçatuba, Campina Grande do Sul - PR, 83430-000 (41) 3679-8100

PROPÓSITO DA INFORMAÇÃO AO PACIENTE E DOCUMENTO DE CONSENTIMENTO

Você está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa, coordenada por um profissional de saúde agora denominado pesquisador. Para poder participar, é necessário que você leia este documento com atenção. Ele pode conter palavras que você não entende. Por favor, peça aos responsáveis pelo estudo para explicar qualquer palavra ou procedimento que você não entenda claramente.

O propósito deste documento é dar a você as informações sobre a pesquisa e, se assinado, dará a sua permissão para participar no estudo. O documento descreve o objetivo, procedimentos, benefícios e eventuais riscos ou desconfortos caso queira participar. Você só deve participar do estudo se você quiser. Você pode se recusar a participar ou se retirar deste estudo a qualquer momento.

Versão ____ data _____

1

INTRODUÇÃO

Varizes são veias dilatadas, tortuosas e alongadas, que apresentam refluxo (sangue no sentido contrário) causando aumento de pressão progressiva, de caráter crônico, provocando sinais e sintomas a médio e longo prazo, que podem ser de grau leve no início, como dor e inchaço nas pernas, assim como de grau acentuado posteriormente, como úlceras e trombose venosa.

O laser é uma espécie de luz muito específica com capacidade muito seletiva de emitir energia térmica e, desde a sua descoberta na década de 60, tem sido empregado no tratamento de várias afecções.

Diversos estudos clínicos usando modelos matemáticos foram realizados na tentativa de descobrir a energia e o comprimento de onda ideal do Laser Endovenoso para melhorar as taxas de oclusão (fechamento) da veia safena magna varicosa.

O presente estudo pretende responder a seguinte questão: Quais as alterações histológicas encontradas nas veias safenas magnas submetidas a termoablação com laser em modelo *ex vivo* (em laboratório) utilizando diferentes comprimentos de onda, potências e velocidades de tração da fibra.

PROPÓSITO DO ESTUDO

Avaliar as alterações histológicas da veia safena magna submetida a termoablação com laser em modelo ex vivo, utilizando diferentes comprimentos de onda, potências e velocidades de tração da fibra.

SELEÇÃO

▲ Critérios de Inclusão:

- Pacientes entre 18 e 70 anos de ambos os sexos;
- Pacientes submetidos previamente ao exame de ecodoppler vascular com indicação de safenectomia através da técnica de fleboextração por eversão, cujas medidas de diâmetros da veia safena magna estão compreendidas entre 3 mm e 10 mm
- Concordarem em participar do estudo e assinaram o termo de consentimento.

▲ Critérios de Exclusão:

- Pacientes cujos diâmetros pré-operatórios da veia safena magna são menores que 3 mm e/ou maiores que 10 mm
- Não concordarem em participar do estudo e/ou não assinaram o termo de consentimento.

PROCEDIMENTOS

Tire suas dúvidas referentes a sua participação voluntária nesse estudo:

1. Como é o tratamento cirúrgico convencional de retirada da Safena (Safenectomia)?

Durante um procedimento de cirurgia de varizes convencional (Safenectomia), o cirurgião faz uma incisão (corte) na virilha e no tornozelo ou joelho e utilizando um instrumental cirúrgico conhecido como fleboextrator puxa e retira a veia de sua perna.

2. Quem será responsável pela indicação e realização da minha cirurgia?

Você será submetido(a) ao tratamento cirúrgico convencional de varizes conforme proposto e indicado pelo seu cirurgião vascular responsável pelo seu caso.

3. Onde será realizada a minha cirurgia?

Será em ambiente hospitalar, no Hospital Angelina Caron, situado na Rodovia do Caqui, 1150, Bairro Araçatuba, Campina Grande do Sul – PR.

4. O que vai ser feito com a veia safena retirada do meu corpo?

Geralmente quando um paciente tem indicação cirúrgica e é submetido a safenectomia (retirada da veia safena) essa veia é descartada após a cirurgia. Nesse estudo a veia safena que será retirada de você devido ao problema de varizes e que seria descartada de rotina, será preparada para posterior utilização em um experimento em laboratório chamado de termoablação com laser endovenoso.

5. Existem riscos potenciais e/ou complicações associadas ao meu procedimento de doação de sangue (20 ml)?

A coleta de sangue (20 ml) não oferece riscos previsíveis. A permissão para a coleta de sangue é voluntária e consentida e será garantido o direito de recusar-se ao procedimento, sem qualquer prejuízo profissional ou pessoal.

6. O que vai ser feito com o sangue retirado do meu corpo?

Nesse estudo o sangue que será doado por você (20 ml) será preparado e utilizado em um experimento em laboratório chamado de termoablação com laser endovenoso.

7. O que se pretende analisar com essa pesquisa?

O objetivo é avaliar em laboratório, as alterações histológicas do tecido da veia safena retirada de seu corpo, utilizando diferentes comprimentos de onda, potências e velocidade de tração da fibra do laser.

8. Existem riscos potenciais e/ou complicações associadas ao meu procedimento?

Como acontece com qualquer intervenção médica, potenciais riscos e complicações também existem e nesse caso a indicação de sua cirurgia e o próprio ato cirúrgico serão de responsabilidade do Cirurgião Vascular responsável pela sua cirurgia.

A simples doação voluntária da veia safena magna que vai ser retirada do seu corpo devido ao problema de varizes, não acarretará em nenhum dano para você, considerando também que ela será avaliada posteriormente em laboratório e que rotineiramente seria descartada após a cirurgia.

PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA:

Sua decisão em participar deste estudo é voluntária. Você pode decidir não participar no estudo. Uma vez que você decidiu participar do estudo, você pode retirar seu consentimento e participação a qualquer momento. Se você decidir não continuar no estudo e retirar sua participação, você não perderá qualquer benefício ao qual você tem direito.

CUSTOS

Não haverá nenhum custo a você relacionado diretamente aos procedimentos cirúrgicos previstos no estudo.

PAGAMENTO PELA PARTICIPAÇÃO

Sua participação é voluntária, portanto você não será pago por sua participação neste estudo.

PERMISSÃO PARA REVISÃO DE REGISTROS, CONFIDENCIALIDADE E**ACESSO AOS REGISTROS:**

O Investigador responsável pelo estudo e equipe irá coletar informações sobre você. Em todos esses registros um código substituirá seu nome. Todos os dados coletados serão mantidos de forma confidencial. Os dados coletados serão usados para a avaliação do estudo, membros das Autoridades de Saúde ou do Comitê de Ética, podem revisar os dados fornecidos. Os dados também podem ser usados em publicações científicas sobre o assunto pesquisado. Porém, sua identidade não será revelada em qualquer circunstância.

Você tem direito de acesso aos seus dados. Você pode discutir esta questão mais adiante com seu médico do estudo.

CONTATO PARA PERGUNTAS

Se você ou seus parentes tiver (em) alguma dúvida com relação ao estudo, direitos do paciente, ou no caso de danos relacionados ao estudo, você deve contatar o Investigador do estudo Dr. Walter Junior Boim de Araujo ou sua equipe; Celular: (41) 9946-2670. Se você tiver dúvidas sobre seus direitos como um paciente de pesquisa, você pode contatar Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) do Hospital Angelina Caron, pelo telefone: 3679-8100. O

CEP trata-se de um grupo de indivíduos com conhecimento científicos e não científicos que realizam a revisão ética inicial e continuada do estudo de pesquisa para mantê-lo seguro e proteger seus direitos.

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO DO PACIENTE:

Eu li e discuti com o investigador responsável pelo presente estudo os detalhes descritos neste documento. Entendo que eu sou livre para aceitar ou recusar, e que eu posso interromper minha participação a qualquer momento sem dar uma razão. Eu concordo que os dados coletados para o estudo sejam usados para o propósito acima descrito

Eu entendi a informação apresentada neste termo de consentimento. Eu tive a oportunidade para fazer perguntas e todas as minhas perguntas foram respondidas.

Eu receberei uma cópia assinada e datada deste Documento de Consentimento Informado.

NOME DO PACIENTE

ASSINATURA

DATA

NOME DO INVESTIGADOR

ASSINATURA

DATA

Versão ____ data _____

8