RONALDO LUCAS

Monitorização e mensuração tomográfica de diferentes técnicas de crioterapia em pele de cães da raça Beagle, e sua relação com as medidas da necrose estimadas pela histopatologia

São Paulo

2004

RONALDO LUCAS

Monitorização e mensuração tomográfica de diferentes técnicas de crioterapia em pele de cães da raça Beagle, e sua relação com as medidas da necrose estimadas pela histopatologia

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária

Departamento:

Clínica Médica

Área de Concentração:

Clínica Veterinária

Orientação:

Prof.Dr. Carlos Eduardo Larsson

São Paulo

2004

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1423
FMVZ

Lucas, Ronaldo

Monitorização e mensuração tomográfica de diferentes técnicas de crioterapia em pele de cães da raça Beagle, e sua relação com as medidas da necrose estimadas pela histopatologia / Ronaldo Lucas. - São Paulo : R. Lucas, 2004.

102 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, 2004.

Programa de Pós-graduação: Clínica Veterinária.
Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Larsson.

1. Crioterapia. 2. Criocirurgia. 3. Tomografia computadorizada.
4. Histopatologia animal. I. Título.

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: LUCAS, Ronaldo

Título: Monitorização e mensuração tomográfica de diferentes técnicas de crioterapia em pele de cães da raça Beagle, e sua relação com as medidas da necrose estimadas pela histopatologia

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Assinatura: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Assinatura: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Assinatura: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Assinatura: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Assinatura: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Dedicatórias

Aos **meus pais**, pois sempre acreditaram, e não pouparam esforços na educação dos filhos.
Jamais conseguiria sem eles.

À minha esposa **Daniela** (faltam poucas horas). Apoio, compreensão, admiração e amor.
Para muitos, apenas palavras, para ela, atitudes.

Ao **Prof. Larsson**, criador da Dermatologia Veterinária no Brasil, que sempre soube dividir seus conhecimentos, além de me ensinar a ensinar. Obrigado pela confiança, amizade e exemplo.

“ Algo só é impossível até que alguém duvide e
acabe provando o contrário. ”

Albert Eisten.

Agradecimentos

Aos Professores **Antônio Fernandes Filho** e **José D'Angelino**, pois sem o apoio de ambos seria impossível concluir este projeto. São líderes pela grandeza das atitudes.

Aos médicos **Humberto Kem Kitadai** e **Everton César de Oliveira**, que acreditam na ciência.

Ao médico **Eugênio Pimentel**, por me ensinar a gostar tanto de criocirurgia

À Prof^a **Maria Lucia Zaidan Dagli**, pelo grande apoio e paciência.

Aos irmãos **Rodrigo Lucas** e **Ricardo Corominas**, pois esse experimento é nosso.

À Prof^a e amiga **Silvia Regina Ricci Lucas**, pelo apoio e ajuda na qualificação.

Ao irmão **Ricardo Lucas** e meus sobrinhos, **Bruno, Érica e Laura**, por fazerem parte da minha vida.

A Prof^a **Márcia Jericó**, pelas aulas trocadas e divididas, além dos sábios conselhos de amiga.

Ao Prof. **Luis Artur**, pelo apoio, amizade e pelos horários de liberação.

À **Renata**, pelo grande apoio no levantamento bibliográfico, fundamental para a elaboração do trabalho.

Aos **funcionários do UNITOX (UNISA)**, e seus estagiários: **Glauco, Rafael, Ceará e Juliana**, pela dedicação e amizade.

Aos veterinários **Miguel, Guto e Tati**, por prestarem grande colaboração ao trabalho.

À **Meire** pela condução do HOVET/UNISA e pela compreensão e apoio.

À **Mari**, que é o grande alicerce do Serviço de Dermatologia do HOVET/USP.

Aos veterinários, e amigos **Ana Balda, Tatiana, Luciana, Boró e Carlão** pelas horas de dermatologia divididas

Às amigas **Adelaide, Cida, Cláudia, Patrícia e Sandra**, pelas orientações sobre as regras, que não podem ser quebradas, mas são altamente **mutantes**.

Aos funcionários **Toninho, Milton, Geraldo, Giba, Lelis, Jesus e Otávio**, por tornarem o clima tão agradável.

À **Elza M.R.B.Faquim** (sem espaço entre os pontos), pela correção desta tese.

A **todos os brasileiros** que recolhem impostos e tornam viável a existência desta Universidade de São Paulo e seu programa de Pós-graduação.

RESUMO

LUCAS, R. **Monitorização e mensuração tomográfica de diferentes técnicas de crioterapia em pele de cães da raça Beagle, e sua relação com as medidas da necrose estimadas pela histopatologia.** [Computed tomography monitoring and mensuration of different cryotherapy techniques on the skin of Beagle dogs and their association with necrosis assessment through histopathological analysis]. 2004. 102 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

O uso do frio pela medicina é muito antigo, utilizado inicialmente de forma empírica, teve grandes avanços nos séculos XIV e XX, evoluindo juntamente com a Física. O surgimento de novas técnicas e equipamentos, possibilitou à crioterapia tornar-se uma importante opção no tratamento de neoplasias, benignas e malignas, de diferentes órgãos (tais como fígado, próstata, pâncreas e mamas) e sistemas (ósseo, neurológico e tegumentar). O grande desenvolvimento tecnológico permitiu além do maior número de indicações, melhores resultados, mormente com o uso de técnicas de imagem para o acompanhamento do procedimento. Porém, poucos são os trabalhos que enfocam a monitorização e mensuração do congelamento, pela tomografia computadorizada, bem como avaliação da necrose obtida. No presente trabalho propôs-se avaliar as relações entre as medidas obtidas pela tomografia computadorizada, em 20 cães da raça Beagle, durante o congelamento por aplicação do nitrogênio pela sonda fechada (75 segundos), spray (75 e 135 segundos) e derramamento (75 segundos), comparando estas medidas com aquelas mensuradas pela histopatologia da necrose provocada, para posteriormente avaliar a efetividade dos métodos e criar protocolos de tratamento. Os valores de diâmetro, raio, profundidade e volume do congelamento foram comparados entre si e, com os respectivos valores da necrose após 96 horas do procedimento. Os valores foram submetidos a análise de variância de medidas repetidas e teste de Bonferroni ($p < 0,05$). Constatou-se que: a técnica de sonda fechada oferece congelamento e subsequente necrose mais superficial que os outros métodos, sendo a técnica menos efetiva; em todas as técnicas o volume, diâmetro e profundidade são inferiores

no tecido necrosado quando comparados aos seus similares naquele congelado; em nenhuma das quatro técnicas a profundidade de congelamento foi equivalente ao seu raio. Finalmente, houve a possibilidade de desenvolvimento de protocolos alternativos de congelamento a partir da profundidade de necrose pretendida (hf), obtendo-se como resultado (sonda - $Di = hf / 0,29$; spray I; $Di = hf / 0,31$; spray II - $Di = hf / 0,35$; derramamento - $Di = hf / 0,38$) o diâmetro do congelamento (Di) necessário para o êxito do tratamento.

Palavras Chave: Crioterapia, criocirurgia, tomografia computadorizada, histopatologia animal.

ABSTRACT

LUCAS, R. **Computed tomography monitoring and mensuration of different cryotherapy techniques on the skin of Beagle dogs and their association with necrosis assessment through histopathological analysis.** [Monitorização e mensuração tomográfica de diferentes técnicas de crioterapia em pele de cães da raça Beagle, e sua relação com as medidas da necrose estimadas pela histopatologia]. 2004. 102 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

The use of cold by Medicine is a very old practice, initially used empirically, which had significant advances in the XIV and XX centuries, developing along with Physics. The appearance of new techniques and equipment turned cryotherapy into an important option in the treatment of benign and malignant neoplasms in different organs (such as the liver, the prostate, the pancreas and breasts) and systems (bone, neurological and tegumentary). The large technological development resulted in a higher number of indications as well as better results, especially with the concomitant use of imaging techniques to follow the procedure. However, few studies focus on the monitoring and mensuration of freezing through computed tomography, as well as the assessment of the resulting necrosis. Our study aims at evaluating the association between the measurements obtained through computed tomography in 20 Beagle dogs during freezing by liquid nitrogen use through a probe (75 sec), spray (75 and 135 sec) and overflow (75 sec), comparing these measurements to those obtained through histopathological analysis of the resulting necrosis, for later evaluation of the effectiveness of the methods and design of better treatment protocols. The values of diameter, radius, depth and volume of freezing were compared among them and also with the respective necrosis values 96 hours after the procedure. The values were submitted to analysis of variance of repeated measurements and Bonferroni test ($p < 0.05$). We observed that the closed probe technique causes a more superficial freezing and resulting necrosis when compared to the other methods, being the less effective technique. In all techniques, the volume, diameter and depth are lower in the necrotic tissue when compared to those in the frozen

tissue; none of the four techniques showed that freezing depth was equivalent to its radius. Finally, alternative freezing protocols could be developed from the depth of the intended necrosis (hf), resulting in the freezing diameter (Di) (probe - $Di = hf/0.29$; spray I; $Di = hf/0.31$; spray II $Di = hf/0.35$; overflow $Di = hf/0.38$), which is necessary for therapy success.

Key words: cryotherapy, cryosurgery, computed tomography, animal histopathology.

Lista de Figuras

Figura 1	Gradientes de temperatura obtidos pela aplicação de Nitrogênio Líquido spray, em relação à profundidade de congelamento, Zacarian, 1985, p.5	53
Figura 2	Tomógrafo (A) e sala de captação computadorizada de imagens (B).	53
Figura 3	Tomografia de membro torácico de cão Beagle submetido a crioterapia pelo método do derramamento	53
Figura 4	Cão, Beagle, sob anestesia geral posicionado em tomógrafo, com marcação de intervalos de 20mm por caneta dermatográfica, para realização de crioterapia.	62
Figura 5	Agulha evidenciada na tomografia computadorizada, para determinação do ponto central da aplicação do nitrogênio líquido.	62
Figura 6	Cão, Beagle, sob anestesia geral posicionado em tomógrafo, sendo submetido a crioterapia, pelo método do spray.	62
Figura 7	Cão, Beagle, sob anestesia geral posicionado em tomógrafo, sendo submetido a crioterapia, pelo método da sonda fechada.	62
Figura 8	Cão, Beagle, sob anestesia geral posicionado em tomógrafo, sendo submetido a crioterapia, pelo método do derramamento.	63

Figura 9	Áreas circunscritas de necrose provocada pela crioterapia em pele de membro torácico de cão da raça Beagle, 96 horas após a procedimento.	63
Figura 10	Sutura aplicada em pele de membro torácico de cão da raça Beagle, após a exérese cirúrgica da área de necrose.	63
Figura 11	Corte histológico do ponto central da área de necrose provocada pela crioterapia, com marcação dos limites de diâmetro (azul) e profundidade (verde).	63
Figura 12	Tomografia de membro torácico de cão Beagle submetido a crioterapia pelo método do derramamento (75 segundos de congelamento), evidenciando a calota esférica de gelo, e suas mensurações de diâmetro (AB) e profundidade (CD). São Paulo, 2004.	74
Figura 13	Tomografia de membro torácico de cão Beagle submetido a crioterapia pelo método da sonda (75 segundos de congelamento) , evidenciando a calota esférica de gelo, e suas mensurações de diâmetro (AB) e profundidade (CD). São Paulo, 2004.	74
Figura 14	Tomografia de membro torácico de cão Beagle submetido a crioterapia pelo método do spray I (75 segundos de congelamento) , evidenciando a calota esférica de gelo, e suas mensurações de diâmetro (AB) e profundidade (CD). São Paulo, 2004.	74
Figura 15	Tomografia de membro torácico de cão Beagle submetido a crioterapia pelo método do spray II (135 segundos de congelamento) , evidenciando a calota esférica de gelo, e suas mensurações de diâmetro (AB) e profundidade (CD). São Paulo, 2004.	74

Figura 16	Representação esquemática, estimadas a partir das médias, do congelamento total (azul + roxo), da área congelada e que não sofreu necrose (somente azul) e da área de necrose (somente roxo), provocadas pela técnica do derramamento.	90
Figura 17	Representação esquemática, estimadas a partir das médias, do congelamento total (azul + roxo), da área congelada e que não sofreu necrose (somente azul) e da área de necrose (somente roxo), provocadas pela técnica da sonda fechada.	90
Figura 18	Representação esquemática, estimadas a partir das médias, do congelamento total (azul + roxo), da área congelada e que não sofreu necrose (somente azul) e da área de necrose (somente roxo), provocadas pela técnica do spray I.	90
Figura 19	Representação esquemática, estimadas a partir das médias, do congelamento total (azul + roxo), da área congelada e que não sofreu necrose (somente azul) e da área de necrose (somente roxo), provocadas pela técnica do spray II.	90

Lista de Gráficos e Quadro

Gráfico 1	Comparação do volume médio do congelamento (Vi) com o volume médio da necrose obtida (Vf), segundo diferentes técnicas de crioterapia, mensurados respectivamente pela tomografia computadorizada e pela histopatologia, em pele íntegra de cães da raça Beagle. São Paulo, 2004.	67
Gráfico 2	Comparação da média dos raios do congelamento (ri) com a média das profundidades obtidas (hi), segundo diferentes técnicas de crioterapia, mensurados pela tomografia computadorizada em pele íntegra de cães da raça Beagle. São Paulo, 2004	70
Gráfico 3	Comparação das médias dos raio da crionecrose (rf) com a média das profundidades obtidas (hf), segundo diferentes técnicas de crioterapia, mensurados pela histopatologia em pele íntegra de cães da raça Beagle. São Paulo, 2004.	71
Quadro 1	Quadro esquemático da estimativa da profundidade de necrose provocado pela sonda e por derramamento direto do nitrogênio. Estimativas a partir dos halos de congelamento (C-1) e de necrose (C-2), em milímetros. Porcentagens médias determinadas no experimento. São Paulo, 2004	86

Lista de Tabelas

Tabela 1	Mensuração e relação das medidas obtidas por tomografia durante o congelamento imediato e da necrose provocada 96 horas após, por histopatologia em pele de cães da raça Beagle, submetidos a aplicação do nitrogênio líquido pelo derramamento (tempo total de 75 segundos). São Paulo, 2004.	64
Tabela 2	Mensuração e relação das medidas obtidas por tomografia durante o congelamento imediato e da necrose provocada 96 horas após, por histopatologia em pele de cães da raça Beagle, submetidos a aplicação do nitrogênio líquido pela sonda metálica congelada (tempo total de 75 segundos). São Paulo, 2004.	65
Tabela 3	Mensuração e relação das medidas obtidas por tomografia durante o congelamento imediato e da necrose provocada 96 horas após, por histopatologia em pele de cães da raça Beagle, submetidos à aplicação do nitrogênio líquido pelo spray (tempo total de 75 segundos). São Paulo, 2004.	65
Tabela 4	Mensuração e relação das medidas obtidas por tomografia durante o congelamento imediato e da necrose provocada 96 horas após, por histopatologia em pele de cães da raça Beagle, submetidos à aplicação do nitrogênio líquido pelo spray (tempo total de 135 segundos). São Paulo, 2004.	66

Tabela 5	Estatística descritiva dos valores obtidos quanto ao volume de necrose em relação ao volume de congelamento (V_f/V_i %), segundo diferentes técnicas de aplicação do nitrogênio líquido, São Paulo, 2004.	67
Tabela 6	Estatística descritiva dos valores obtidos quanto ao diâmetro de necrose em relação ao diâmetro de congelamento (D_f/D_i %), segundo diferentes técnicas de aplicação do nitrogênio líquido, São Paulo, 2004.	68
Tabela 7	Estatística descritiva dos valores obtidos da profundidade de necrose em relação a profundidade do congelamento (h_f/h_i %), segundo diferentes técnicas de aplicação do nitrogênio líquido, São Paulo, 2004.	68
Tabela 8	Estatística descritiva dos valores obtidos da profundidade de congelamento em relação ao seu raio (h_i/r_i %), segundo diferentes técnicas de aplicação do nitrogênio líquido, São Paulo, 2004.	69
Tabela 9	Comparações múltiplas, após análise de variância com medidas repetidas, para averiguação de diferenças estatisticamente significantes entre as técnicas ($p < 0,005$), São Paulo, 2004.	69
Tabela 10	Estatística descritiva dos valores obtidos da profundidade de necrose em relação ao raio de necrose (f_i/r_f %), segundo diferentes técnicas de aplicação do nitrogênio líquido, São Paulo, 2004.	70

Tabela 11	Comparações múltiplas, após análise de variância com medidas repetidas, para averiguação de diferenças estatisticamente significantes entre as técnicas ($p < 0,005$), São Paulo, 2004.	71
Tabela 12	Estatística descritiva dos valores obtidos da profundidade de necrose em relação ao diâmetro de congelamento (hf/Di %), segundo diferentes técnicas de aplicação do nitrogênio líquido, São Paulo, 2004.	72
Tabela 13	Comparações múltiplas, após análise de variância com medidas repetidas, para averiguação de diferenças estatisticamente significantes entre as técnicas ($p < 0,005$), São Paulo, 2004.	72
Tabela 14	Fórmulas de obtenção do halo de congelamento necessário, a partir da profundidade de necrose pretendida, segundo a técnica de aplicação de crioterapia. São Paulo, 2004.	73

Lista de Abreviaturas

Di	Diâmetro inicial - Diâmetro congelado (mm)
hi	Profundidade inicial - Profundidade congelada (mm)
hi / ri (%)	Profundidade congelada em relação ao raio de congelamento
Vi	Volume congelado (em milímetros cúbicos)
Df	Diâmetro final - Diâmetro da necrose (mm)
hf	Profundidade final - Profundidade da necrose (mm)
hf / rf (%)	Profundidade da necrose em relação ao raio da necrose
Vf	Volume da necrose (em milímetros cúbicos)
Vf / Vi (%)	Volume da necrose em relação ao volume congelado
hf / Di (%)	Profundidade da necrose em relação ao diâmetro congelado
Df / Di (%)	Diâmetro da necrose em relação ao diâmetro congelado
hf / hi (%)	Profundidade da necrose em relação à profundidade congelada
Tomo	Tomografia computadorizada
Derrame	Derramamento
Derra/o	Derramamento
mm	Milímetro

Sumário

1 Introdução.....	22
2 Revisão de Literatura.....	23
2.1 Mecanismos indutores da lesão tecidual quando da crioterapia.....	26
2.2 Mecanismos de morte celular induzida pelo frio - Crionecrose.....	27
2.2.1 Fase imediata.....	27
2.2.2 Fase Retardada.....	29
2.2.3 Fase Tardia.....	31
2.3 Agentes criógenos.....	32
2.4 Técnicas de preparo, de aplicação e equipamento.....	33
2.4.1 Preparo do paciente.....	34
2.4.2 Equipamentos recomendados.....	34
2.5 Temperatura e tempo do procedimento.....	38
2.6 Ciclos de congelamento-descongelamento.....	39
2.7 Número de aplicações.....	41
2.8 Aplicações.....	42
2.9 Fatores relativos às lesões do paciente.....	43
3 Objetivos.....	54
4 Materiais e Métodos.....	56
4.1 Avaliação do congelamento.....	56
4.2 Avaliação da crionecrose.....	58

4.3 Cálculo do volume.....	59
4.4 Análise dos resultados.....	60
5 Resultados.....	64
5.1 Volume da necrose em relação ao volume do congelamento (V_f/V_i).....	67
5.2 Profundidade e diâmetro da necrose em relação àquelas do congelamento (h_f/h_i e D_f/D_i).....	68
5.3 Profundidade de congelamento em relação ao seu raio (h_i/r_i).....	69
5.4 Profundidade da necrose em relação ao seu raio (h_f/r_f).....	70
5.5 Profundidade da necrose em relação ao diâmetro do congelamento (h_f/D_i).....	71
6 Discussão.....	75
6.1 Monitorização da formação da calota de gelo.....	75
6.2 Relação entre o volumes de congelamento e de necrose tecidual (V_f/V_i).....	76
6.3 Relação entre os diâmetros de congelamento e da necrose tecidual (D_f/D_i).....	78
6.4 Relação entre o raio e a profundidade de congelamento (h_i/r_i).....	80
6.5 Relação entre as profundidades do congelamento e da necrose (h_f/h_i).....	82
6.6 Relação entre o diâmetro de congelamento e a profundidade da necrose (h_f/D_i).....	84
6.7 Relação entre as profundidades da necrose em relação ao seu raio obtidas pelo congelamento (h_f/r_f).....	85
7 Conclusões.....	91
Referências.....	94

1 Introdução

O uso do frio pela medicina é muito antigo. Inicialmente utilizado de forma empírica, teve grandes avanços nos séculos XIV e XX, embasado na evolução da física com e, principalmente, pelo conhecimento que se adquiriu sobre a liquefação de gases. Pode-se utilizar o frio de duas maneiras, aparentemente paradoxais: a conservação e a destruição. O conhecimento de diferentes técnicas permite a manutenção pelo frio (criopreservação de medula óssea, sangue e gametas), enquanto a destruição de tecidos é promovida pela crionecrose. Entre estes dois pólos extremos, alguns autores consideram como crioterapia a utilização de baixas temperaturas na fisioterapia para tratamento de processos mórbidos articulares e musculares (MYRER et al. 2001; MERRICK et al. 2003; RUBLEY et al. 2003). Porém alguns outros autores como Seifert et al. (2003), utilizam estes termos como sinônimos. A chamada moderna crioterapia evoluiu há aproximadamente 40 anos. Cooper (1963), um neurocirurgião foi o primeiro a utilizar aparelho portátil para tal fim, dando grande impulso a esta modalidade terapêutica. Segundo Homasson (2001) a crioterapia tem sido amplamente utilizada no tratamento de dermatopatias. É tida como uma novidade em alguns países, embora em outros, como França e países do leste europeu têm sido largamente utilizada. Nos EUA, têm ressurgido após algumas décadas de abandono. Isto se deve ao surgimento de novas técnicas e equipamentos, possibilitando a crioterapia tornar-se uma importante opção no tratamento de neoplasias, benignas e malignas, de diferentes órgãos (tais como fígado, próstata, pâncreas e mamas) e sistemas (ósseo e neurológico). O grande desenvolvimento tecnológico permitiu este maior número de indicações, além de melhores resultados com o uso desta técnica (SANDISON et al., 1998; DANIEL et al., 1999; TACKE et al., 1999; LEE JR. et al., 1999; SILVERMAN et al., 2000; YANG et al., 2000; KUSZYK et al., 2000; GRANOV et al., 2001; WEI et al., 2002; SALIKEN et al., 2002; BUTTS et al., 2003; TRAORÉ et al., 2003; MALA et al., 2003; ESCUDERO et al., 2003; 2003; FOURNIAL, 2004).

2 Revisão de Literatura

A crioterapia também denominada de crioablação, criocirurgia ou cirurgia por congelamento, é uma modalidade terapêutica onde o congelamento é utilizado para destruir tecidos comprometidos. Etimologicamente o prefixo crio, deriva do grego “kruos” significando frio. Foi, inicialmente, conceituada, na década de 60 por Cooper (1963) como a aplicação do frio, com fins terapêuticos, visando o congelamento dos tecidos biológicos, o que acarretaria inibição fisiológica ou a destruição tecidual. Já, segundo Goldstein e Hess (1977) seria o procedimento onde haveria a destruição seletiva de tecidos quando da interposição em alternância de ciclos de congelamento e de descongelamento. Na década de 80, Withrow (1980) referiu-se a tal modalidade de terapia como sendo o uso de baixas temperaturas, induzindo a morte celular. Finalmente, ainda em termos conceituais, Hong e Rubinsky (1994), por sua vez, a definiram como a destruição “*in situ*” de tecidos cancerígenos pelo emprego do congelamento localizado.

Este tipo de terapia já fora referido na literatura médica que antecede a era cristã. Homero (900 a.C.) e Hipócrates (400 d.C.) descreveram os efeitos benéficos do frio no controle local de hemorragias e na diminuição de edemas quando do tratamento de ferimentos (PODKONJAK, 1982a).

No ano de 25 d.C., Cornelio Celso foi o primeiro a descrever lesões provocadas pelo frio, classificando-as desde graus leves até a gangrena. Galeno (70 d.C.) menciona a diminuição de sensibilidade dolorosa após o tratamento de lesões pelo frio, em seu manuscrito intitulado, em inglês, como “Pain as a means of diagnostic” (MARQUES, 1989).

O frio, como agente anestésico local, já fora descrito, na literatura médica, em 1050 d.C. Este tipo de procedimento anestésico foi estudado, por físicos italianos, ao longo dos séculos XVI e XVII. O barão francês Dominique Jean Larrey executava amputações, nos soldados do exército de Napoleão, utilizando-se do frio para a diminuição da dor (PODKONJAK, 1982a).

O pioneiro na anestesia, dita por “refrigeração” (hipotermia), foi James Arnott, que também recomendou o frio para fins terapêuticos. Usando de uma mistura de gelo e sal, que chega

va a atingir temperaturas de -10°C , tratava uma variedade de condições mórbidas, como nevralgia, prurido e cefaléia. Em 1845, foi também, este inglês, o pioneiro na aplicação de tal método no tratamento de neoplasias inoperáveis em regiões cervicais e torácicas. Na virada do século, o congelamento foi temporariamente abandonado, mas, em 1899, White descreveu a utilização do então, recentemente, desenvolvido “ar líquido” no tratamento de lesões superficiais de pele e de doenças dermatológicas como o lúpus, os epitelomas e os cancróides (BAXTER, 1977; PODKONJAK, 1982a).

Aproximadamente, 40 anos mais tarde, Temple Fay, frustrado com os resultados nos casos de câncer inoperáveis e, provavelmente, estimulado pelas observações de Geschichter e Copeland (quais sejam, “que as metástases de tumores ocorriam preferencialmente em partes quentes do corpo”), reavivou o interesse do congelamento localizado.. Entre 1936 e 1940, cerca de 124 pacientes com carcinoma avançado, glioblastoma e doença de Hodgkin, foram submetidos ao congelamento, localizado ou generalizado. O instrumental era improvisado, com colheres de chá soldadas, frente a frente para deslizarem em craniotomias ou “instrumentais” especificamente criados para “conduzir” fluidos refrigerados. Dezenove (15,3%) pacientes morreram. Dos 124 pacientes, 119 (96%) apresentaram alívio da dor. Oito (6,5%) pacientes com metástase sobreviveram por mais de cinco anos, sendo que um paciente permaneceu vivo por mais um vintênio (PODKONJAK, 1982a).

Em 1939, no III Congresso Internacional do Câncer, Temple Fay apresentou trabalho intitulado: “Observações na refrigeração prolongada de humanos”. Os congressistas alemães aparentemente adotaram as idéias de Temple e se tornaram hábeis na técnica. Com o avanço da II Guerra Mundial, os nazistas utilizaram a hipotermia, sem prévia anestesia, em prisioneiros de campos de concentração, especialmente em Dachau. Em função disto, por muito tempo, houve uma natural associação da crioterapia à atrocidades resultando num atraso de pelo menos 15 anos na evolução do procedimento crioterápico (PODKONJAK, 1982a; HOYT JR.; SEIM III, 1981; MARQUES, 1989).

Paulatinamente, excelentes investigações renovaram o interesse do uso do frio como pro-

cedimento de terapia. Em 1950, Allington utilizou zaragatoas embebidas em nitrogênio no tratamento de doenças de pele. (HOYT JR.; SEIM III, 1981). A crioterapia moderna iniciou-se da associação de um médico Irving Cooper e um engenheiro, Arnold Lee, que desenvolveram um aparelho capaz de conduzir o nitrogênio por uma sonda e propiciar o congelamento controlado de tecidos cerebral com boa precisão. O princípio utilizado com o auxílio deste aparelho serviu de protótipo para inúmeros equipamentos empregados até os dias de hoje, incluindo aquele desenvolvido por Zacarian e o engenheiro Bryne (Brymill Co), em 1968, o primeiro comercialmente viável e que depois daria origem ao Cry-Ac® (KUFLIK et al. 2000). Inicialmente desenvolvido para o tratamento da síndrome de Parkinson e de outras doenças neurológicas, foi rapidamente utilizado por outros médicos para destruição de tecidos em diferentes regiões corpóreas (GREINER et al, 1975; BORJRAB, 1978; PODKONJAK, 1982a, RUBINSKY, 2000).

Entre os anos de 1961 e 1970 a crioterapia foi utilizada em distintos tratamentos de diferentes especialidades, encontrando aplicação em ginecologia, neurologia, proctologia e ortopedia, dentre outras. Naquela década, também, muitos engenheiros colaboraram no desenvolvimento de equipamentos (RUBINSKY, 2000). A crioterapia é provavelmente a primeira técnica pouco invasiva para o tratamento de tecidos neoplásicos, fato este que propiciou seu grande desenvolvimento na década de 60. Entretanto, esta mesma natureza pouco invasiva criou obstáculos para o preciso controle deste procedimento, mormente quando aplicado em lesões de grandes dimensões ou em órgãos internos. Esta falta de precisão, foi decisiva para o decréscimo da sua utilização e substituição por outras técnicas, na década de 80, restringindo, novamente, o seu emprego à dermatologia e à ginecologia. Porém, na década 90, o avanço de modelos matemáticos e o desenvolvimento de técnicas de imagem, como a: ultra-sonografia, tomografia computadorizada e ressonância magnética, propiciaram o “renascimento” e novas indicações para a aplicação do frio na medicina. (RUBINSKY et al., 1995; SALIKEN et al. 2002, WEI et al. 2002, SANDISON 2002, ESCUDERO et al. 2003, TRAORÉ et al. 2003, BUTTS et al. 2003, MALA et al. 2003.)

Na medicina veterinária cotejando os relatos do emprego da crioterapia com aqueles da

medicina humana pode-se verificar que até meados deste século raros eram os trabalhos relativos ao emprego de agentes criógenos em lesões evidenciadas em animais. Pela compilação da bibliografia depara-se com o trabalho pioneiro de Openchowski que, em 1883, realizou estudos de fisiologia, utilizando-se do congelamento localizado da região do córtex cerebral de cães. Balthasar, em 1957, desenvolveu estudo semelhante em cérebros de gatos, concluindo que o frio seria um excelente método para produzir necrose tecidual aliando-se à esta observação a baixa ocorrência de hemorragia (PODKONJAK, 1982a; MARQUES, 1989).

Na Universidade de Washington, quando Farrell (1978) fixou um fragmento de gelo seco, sob bandagem, em cão anestesiado para satisfazer sua curiosidade quanto a um eventual controle da dor, observou despigmentação pilar no local. Como histologicamente os folículos continuavam intactos, este autor propôs o termo: criocirurgia homocelular, que ficou, a posteriore, internacionalmente conhecido por sua aplicabilidade na identificação de animais. Em 1975 aquele autor havia tratado, pela primeira vez, um caso de sarcóide equino com gelo seco (PODKONJAK, 1982a). Na década de 70, veterinários ingleses e americanos, passam a publicar grande número de trabalhos, retratando a experiência obtida, em animais de guarda e companhia (GREINER et al, 1975).

No contexto da medicina veterinária, a crioterapia tem maiores possibilidades de emprego na dermatologia. Lucas e Larsson (2000) utilizaram tal técnica no tratamento de diferentes dermatopatias, mormente as neoplásicas, em carnívoros domésticos, comprovando a efetividade de tal modalidade terapêutica na clínica veterinária de pequenos animais.

2.1 Mecanismos indutores da lesão tecidual quando da crioterapia

Tanto em medicina veterinária como na humana, a crioterapia inclui-se como uma das modalidades de tratamento de doenças de cunho inflamatório, neoplásico ou degenerativo, dentre outras. Doenças estas que não respondem adequadamente ou são de difícil resolução com o uso de procedimentos cruentos convencionais. O objetivo principal da terapia (GREINER et al.,

1975) é o de destruir as células envolvidas na área tecidual alvo, acarretando um mínimo de lesão no tecido dito normal. Antes de se discorrer sobre indicações, desta modalidade de condu- ta, deve-se compreender as alterações na biologia dos tecidos orgânicos, resultantes da crionecrose, embasando-se no disposto na bibliografia especializada. Muitas teorias têm sido confrontadas na elucidação da morte tecidual provocada pela crioterapia. A primeira e a mais estudada é a injúria celular direta. A extrema temperatura provoca danos ao “maquinário” celu- lar levando a célula à morte. Outros mecanismos de acometimento tecidual pelo frio envolvem as alterações vasculares do tecido congelado e, finalmente , uma aventada estimulação imunológica, propiciada pela lesão celular, revelando ao organismo antígenos-alvo intracelulares em grande quantidade (HOFFMANN; BISCHOF, 2002).

2.2 Mecanismos de morte celular induzida pelo frio - Crionecrose

Estes eventos ocorridos na aplicação de baixas temperaturas em tecidos vivos podem ser subdivididos, segundo o tempo em fases: imediata, retardada ou tardia.

2.2.1 Fase imediata

Tal fase ocorre durante o ciclo de congelamento ou imediatamente após o descongelamen- to. Existe a comprovação de sua ocorrência por diferentes experimentos de congelamento de células *in vitro* (GAGE; BAUST 1998; YANG et al., 2000; KORPAN; ZHARKOV, 2001). Al- guns mecanismos estão envolvidos na destruição instantânea das células, e, provavelmente, ocorrem simultaneamente:

Desidratação e concentração de solutos: A água contida nos tecidos, especialmente a água intersticial livre é “utilizada” para formar cristais. Tal fato produz um estado hiperosmolar, que extrai água do meio intracelular e tem efeito na indução de uma concentração tóxica de eletrólitos que, por si só, acarreta num dano irreversível. Há algumas explicações plausíveis para que tal dano ocorra: a alta concentração de eletrólitos pode causar modificações nas macromoléculas, remover lipídios das membranas celulares e/ou causar bruscas mudanças no pH, interromper a ação de enzimas e desestabilizar as membranas (LANE, 1974a; SEIM III, 1980; GAGE; BAUST, 1998; HOFFMANN; BISCHOF, 2002). Este mecanismo é observado na periferia do congelamento, na transição entre o tecido congelado e o tecido normotermico, onde a cristalização da água ocorre de maneira mais lenta (GAGE; BAUST, 1998; HOFFMANN; BISCHOF, 2002).

Formação de cristais de gelo: A formação de cristais de gelo, intra ou extracelular, depende da velocidade com que o tecido é congelado e sequencialmente descongelado. O processo congelamento/descongelamento, em crioterapia, é denominado de ciclo. O congelamento lento produz grandes cristais, que se dispõem, principalmente, fora das células, onde serão menos letais acarretando, porém, para que se mantenha o equilíbrio osmótico, a passagem de água do meio intracelular para o extracelular, que levará a uma maior concentração de eletrólitos dentro das células. À medida que a concentração destes eletrólitos aumenta, maior é a morte celular, com já referido.

Quando o congelamento ocorrer rapidamente, a célula não é capaz de perder água para o meio externo, na tentativa de manter o equilíbrio, e formar-se-ão cristais intracelulares. Aumentando a velocidade de congelamento há a probabilidade de formação de cristais intracelulares menores podendo, eventualmente, formam-se cristais tão pequenos que são inócuos para as células. Se ocorrer, na seqüência, o descongelamento lento os pequenos cristais, inicialmente inócuos, irão se converter em grandes cristais, muito mais deletérios para a célula. Este processo é denominado recristalização. Há evidências de que a injúria celular, no caso de congelamento rápido, se dá mais pela recristalização quando do descongelamento, do que propriamente

pelo congelamento (LANE, 1974b; WITHROW et al, 1975; SEIM III, 1980). Segundo Gage e Baust (1998), uma vez formados os cristais intracelulares, há a ruptura de organelas e membranas que provocam a morte celular, estas alterações são denominadas de choque térmico (SEIM III, 1980; WITHROW, 1980; GOURLEY, 1985).

Desnaturação de proteínas : O congelamento pode afetar diretamente os constituintes moleculares das células. Os complexos lipoproteicos da membrana celular são ligados por forças muito instáveis, que serão alteradas pelo congelamento, causando profundas mudanças físicas, alterando estes complexos lipo-proteicos e destruindo, conseqüentemente, as membranas celulares. A perda das membranas provoca uma permeabilidade a íons o que determinará, por sua vez, um aumento de volume celular e, finalmente, sua destruição. Estas alterações devem ocorrer em todas as membranas de uma célula, como as membranas mitocôndriais, microssomais e nucleares. As rápidas alterações eletrolíticas que ocorrem nestas situações também têm sido incriminadas como causa de danos às proteínas e aos sistemas enzimáticos (SEIM III, 1980; MARQUES, 1989, HOFFMANN; BISCHOF 2002). Estudos ultra-estruturais confirmam que, na primeira hora após o congelamento, observam-se ruptura da membrana celular, rarefação e posterior condensação da substância fundamental, tumefação do retículo endoplasmático rugoso e de mitocôndrias (MARQUES, 1989).

2.2.2 Fase Retardada

Esta fase acarretada pela estase vascular ocorre algumas horas após o final do ciclo de congelamento/descongelamento.

Estase vascular : o seu desenvolvimento está restrito, principalmente, ao local de exposição ao criógeno, sendo muito estudado em lesões cutâneas causadas pela neve. A perda de

circulação, e a conseqüente anóxia celular são os principais fatores envolvidos na morte tecidual. Gage e Baust (1998) relataram que a estase vascular ocorre por uma série de mudanças microcirculatórias no decorrer do congelamento. Alguns experimentos realizados em pele de hamsters e em fígado de ratos demonstraram maiores alterações quando de temperaturas inferiores a 20°C negativos. A resposta inicial do tecido refrigerado é de vasoconstrição e diminuição do fluxo sanguíneo. Com a evolução, quando do congelamento completo, a circulação cessa. Quando o tecido descongela, a aproximadamente, 0°C, a circulação retorna, porém com a vasodilatação e o aumento de permeabilidade vascular, desenvolve-se o edema que perdura por cerca de duas horas. Na seqüência ocorre lesão na junção endotelial, devido a destruição de suas células, da distensão vascular (provocada pelo congelamento) e, finalmente, pelas alterações envolvidas na reperfusão do tecido, que provocam liberação de radicais livres e ativação neutrofílica. Estas lesões endoteliais agravam o aumento da permeabilidade e edema já presentes, além de provocar agregação plaquetária, formação de microtrombos e interrupção da circulação em, aproximadamente, 30-35 minutos a contar do descongelamento. A perda de suprimento sanguíneo priva o tecido de qualquer possibilidade de vida, resultando em necrose uniforme, poupando apenas a periferia da região previamente congelada. (GAGE; BAUST, 1998; HOFFMANN; BISCHOF, 2002). Experimentos adrede realizados demonstram uma diminuição inicial na circulação de áreas submetidas ao congelamento sendo esta, provavelmente, devido ao arterioespaço. (SEIM III, 1980). Após 30 minutos de submissão à temperatura de 20°C negativos toda circulação encontraria-se interrompida, havendo trombose completa dos vasos, com sinais de necrose isquêmica do tecido adjacente (PIMENTEL, 1997). Estudos experimentais com o emprego de corantes ajudam a elucidar as alterações circulatórias. Após três a quatro horas, no pós-congelamento, já existe um edema discreto, e o corante injetado não consegue perfundir por toda a área. Com oito a 12 horas, o edema já é mais acentuado e esta porção edemaciada torna-se maior. A área com deficientemente perfundida é sempre menor que a área congelada e será, ainda menor, se próximo a ela estiver situada uma grande artéria (MARQUES, 1989).

Histologicamente, todo este processo assemelha-se a um infarto, havendo uma tênue linha de divisão entre o tecido normal e aquele congelado. Apenas a microcirculação é comprometida, as grandes artérias manterão sua função mesmo após o seu congelamento (WITHROW, et al 1975).

2.2.3 Fase Tardia

Existe a possibilidade teórica de ocorrer, tardiamente, a denominada “fase imunológica”, acarretando assim um especial interesse no tratamento de neoplasias malignas. Tal fenômeno seria devido à formação de anticorpos antineoplásicos, resultantes da crioterapia, que alteraria a constituição antigênica celular (SEIM III, 1980; GAGE; BAUST, 1998; KUFLIK et al., 2000; RUBINSKY, 2000).

Experimentalmente demonstrou-se que linfócitos, provenientes de soro de animais portadores de neoplasias, tratados com crioterapia, quando transfundidos em animais com blastomas semelhantes, demonstram ser muito mais citotóxicos que aqueles transfundidos a partir de sangue de animais não tratados. Esta resposta tem-se demonstrado ser específica, para cada tipo de tecido, e é estimulada pela liberação de antígenos específicos da neoformação, durante ou após o congelamento (MARQUES, 1989).

PODKONJAK, refere, em artigo publicado em 1982, à observações clínicas de estimulação imunológica em casos de sarcóide em eqüinos submetidos à crioterapia.

A crioterapia pode produzir (PODKONJAK, 1982a) uma resposta definida e específica voltada aos tecidos neoplásicos em leporinos. Após procedimento crioterápico, detectaram-se anticorpos circulantes contra componentes da glândula prostática de coelhos. Tais anticorpos são detectados depois de decorridas quatro horas do tratamento. Títulos máximos destes são evidenciados entre sete e 10 dias. Crioterapias subsequentes eliciam níveis ainda maiores de anticorpos circulantes.. NEEL et al (1970), aventaram, ainda, que a necrose provocada pela crioterapia liberaria antígenos, previamente localizados, nas correntes sanguínea e linfática,

provocando uma resposta imunológica de maior magnitude.

Observações clínicas, feitas por Dawber (2001) e Tanaka et al. (2001) comprovaram a existência de diminuição de metástases à distância, demonstrando sem precisar o mecanismo gerador, à existência deste fato. Destarte estudos pouco mais recentes puseram em dúvida tal ação decorrente do procedimento, não se obtendo aumento da resposta imunológica após a crioblação (HOFFMANN; BISCHOF, 2002). Há, finalmente,disposta na bibliografia as citações de Hoffmann e Bischof (2002) a respeito do efeito deletério da hipotermia, na periferia da lesão criotratada, provocando aumento da apoptose e destruindo clones de células neoplásicas, similarmente a outros fatores de injúria tecidual, como a hipóxia e a acidose.

Nem todas as células de uma determinada área, submetida à crioterapia, são destruídas em um único ciclo de congelamento - descongelamento. Para que se tenha mais êxito nesses procedimentos deve-se levar em consideração alguns pontos, tais como: criógeno utilizado, equipamento e técnicas de aplicação, duração e temperatura do congelamento, relação entre os tempos de congelamento e descongelamento, número de ciclos e fatores intrínsecos ao próprio paciente.

2.3 Agentes criógenos

Os agentes criógenos são gases que podem ser convertidos a seu estado líquido e que têm a capacidade de extrair calor de tecidos vivos. Tal capacidade irá variar de acordo com o modo de aplicação e com o agente utilizado pois, distintos gases atingem diferentes temperaturas ou pontos de ebulição (BOJRAB, 1978; GREINER et al, 1975). Os criógenos mais, freqüentemente, utilizados são: o nitrogênio líquido e o argônio. Os óxido nitroso, dióxido de carbono, “freons”, oxigênio e o propano líquidos, são substâncias que foram sendo gradativamente abandonados por induzirem temperaturas pouco agressivas ou, ainda por seu risco quando da manipulação.

O nitrogênio líquido é, dentre os agentes criógenos, aquele mais utilizado na crioterapia, em todas as latitudes. Atinge a temperatura de 195,8°C negativos. É incolor, inodoro, ininflamável,

atóxico e inerte. Pode ser manipulado pelos médicos veterinários ou auxiliares destes, com um mínimo de precauções, que incluem: não manipular metais congelados pelo nitrogênio, não acondicionar em recipientes selados, que não sejam, aqueles apropriados e, tampouco, em recipientes de plástico e, finalmente, não ter contato direto com o líquido. Deve ser acondicionado em botijões apropriados, com distintas capacidades de armazenamento (de 10-50 litros do líquido). O nitrogênio líquido é dos criógenos o mais barato em termos de custo. É, ainda, um criógeno extremamente potente. Tem a maior capacidade de penetração em tecidos, além de promover um congelamento extremamente rápido quando cotejando aos com seus congêneres (GREINER et al, 1975; GOLDESTEIN; HESS, 1976; GOLDESTEIN; HESS 1977; BAXTER, 1977; BOJRAB, 1978; SEIM III, 1980; PODKONJAK, 1982a; MARQUES, 1989; THAI; SINCLAIR, 1999; DAWBER 2001, LUCAS; LARSSON, 2001; DAWBER, 2002; SILVERMAN et al., 2000; KORPAN; ZHARKOV, 2001; KORPAN, 2001; ROBINSON et al., 2001).

O argônio, para o congelamento, alternado com o hélio, para o aquecimento, utilizam-se do princípio de Joule-Thompson (quando um gás passa sobre pressão por um orifício pequeno e posteriormente se expande, a temperatura cai rapidamente) e têm sido utilizados mais recentemente em aparelhos de crioterapia computadorizados. (SILVERMAN et al., 2000; KORPAN, 2001; SALIKEN et al., 2002; BUTTS et al., 2003; MALA et al., 2003; ESCUDERO et al., 2003).

2.4 Técnicas de preparo, de aplicação e equipamento

A escolha do tipo de equipamento, do agente criógeno e da forma de aplicação está relacionada, principalmente, ao diagnóstico do quadro mórbido, do tipo e da fase evolutiva da lesão, do estado de higiene e do temperamento do paciente e, até mesmo, em função da estimativa de custo e da aparelhagem disponível. Para o estabelecimento do diagnóstico e da escolha da técnica mais adequada é imprescindível que se realize a biópsia seguida de exame histopatológico. Para um maior sucesso do procedimento, em caso de se tratar de pacientes idosos e de alto risco,

pode-se realizar a biópsia no ato crioterápico (LANE, 1974a; HOYT JR.; SEIM III, 1981; SEIM III; HOYT JR., 1982; GOURLEY, 1985; MAIA; RIBEIRO, 1997).

Aliado ao fato de que a crioterapia com o nitrogênio líquido ser a mais difundida e aquela que tem as maiores indicações nos protocolos de terapia, em medicina humana e veterinária, as variantes no preparo do paciente e da lesão a ser tratada, os tipos de equipamentos, as técnicas de sua aplicação, dispostas na bibliografia especializada, estão relacionadas ao nitrogênio líquido.

2.4.1 Preparo do paciente

Deve-se sempre utilizar prévia anestesia quando do procedimento crioterápico. Esta é executada para conter os movimentos ou o próprio animal, atenuando o desconforto, a dor e o pânico que por vezes se manifestam, quando da terapia. Dependendo do local de localização da lesão e da cooperação do paciente a anestesia pode variar desde uma anestesia local até aquela dita geral. Para a maioria dos chamados pequenos procedimentos basta a tranquilização química do paciente, associada por vezes à anestesia local. Pode-se, ainda, utilizar anestesia local com duas funções. A primeira de anestesiá-lo propriamente dito e a segunda para promover a balonização (ou seja, injetando por baixo da lesão, o anestésico local, este a sobrelevará) afastando-a de vasos que eventualmente estejam situados abaixo dela (HOYT JR.; SEIM III, 1981; SEIM III; HOYT JR., 1982; GOURLEY, 1985, LUCAS; LARSSON, 2001; WEI et al., 2002; SHIBATA et al., 2002).

2.4.2 Equipamentos recomendados

Para a aplicação do nitrogênio líquido pode-se, basicamente, utiliza-se de: zaragatoa, spray,

sondas e, menos freqüentemente, do derramamento direto do nitrogênio. Cada tipo de equipamento é o mais apropriado para uma determinada lesão, porém há lesões que podem ser tratadas por mais de um equipamento, em função de preferência pessoal e da experiência do profissional veterinário.

Zaragatoa: procedimento dos mais simples e menos oneroso. Esta deve ser imersa no criógeno, aplicando-a, a seguir, direta, e imediatamente após, por sobre a lesão, que, por sua vez, deve ter diâmetro menor que aquela da superfície com a qual entrará em contato. Deve-se aplicar a haste de algodão verticalmente à lesão (SAXE; Mc DONALD, 1976; DAWBER, 2001). O parâmetro a ser adotado, em termos de finalização do procedimento, é a observação da formação de halo branco de congelamento, ao redor da lesão. Lesões de tamanho reduzido necessitam de um menor tempo de congelamento comparativamente às lesões maiores. Pode-se necessitar de várias repetições do procedimento para a obtenção do resultado ansiado (GREINER et al, 1975; BAXTER, 1977; DAWBER, 2001).

Spray: é o procedimento mais difundido. Baseia-se no princípio de volatilização do nitrogênio líquido que, quando confinado em recipiente fechado, tende a buscar a abertura existente (GREINER et al, 1975; WITHROW et al, 1975; GOLDESTINE; HESS, 1976; HOYT, JR.; SEIM III, 1981; SEIM III; HOYT, 1982; WITHROW, 1989). A pressão será inversamente proporcional ao diâmetro do orifício de saída. Existem disponíveis alguns tipos distintos de aparelhos, porém que sempre se baseiam no princípio, ou seja, o jato de nitrogênio sai por orifícios, de diâmetros pequenos e variados, das diferentes ponteiros (KORPAN, 2001). Na dependência do diâmetro das ponteiros, padronizados por cada fabricante, o nitrogênio será expelido numa mistura de líquido-vapor que pode variar na proporção de 15 a 85% de líquido e de 85 a 15% de vapor, sendo que a maior quantidade de líquido retrata uma maior potência do equipamento (BRYNE, 1980). A velocidade de saída do nitrogênio é controlada por um gatilho, constituinte do aparelho (SEIM III; HOYT, 1982; MARQUES, 1989). É possível, com este método, tratar

lesões planas ou em relevo. Não há necessidade de aplicação em um único ponto, embora a aplicação no ponto médio da lesão seja a mais utilizada (GOLDESTEIN; HESS, 1976; GOLDSTEIN; HESS, 1977; DAWBER, 2001).

A escolha da ponta, com seu respectivo orifício varia de acordo com o tamanho da lesão. Sendo que quanto maior a lesão, maior deve ser o orifício. Por vezes, para se manter o halo de congelamento desejado é necessário que o jato seja intermitente, até que se atinja o tempo previsto (MARQUES, 1989; THAI; SINCLAIR, 1999; KORPAN 2001; DAWBER, 2001). Com o spray há a possibilidade de tratamento de lesões lineares, nas quais se faz um movimento de vaivém (também conhecido como “método do pincel”), ou de lesões geográficas onde se aplica de modo circular ou em movimentos em espiral (MAIA; RIBEIRO, 1997; THAI; SINCLAIR, 1999). A desvantagem do spray (PIMENTEL, 1997; DAWBER, 2001), é o risco de insuflação do subcutâneo, quando utilizado em úlceras ou fístulas. O emprego do spray inclui-se no chamado sistema aberto, quando o jato é direcionado para a lesão, sem nenhum aparato para controlá-lo. Pode ser chamado de confinado, quando se utiliza algum utensílio para direcionar o jato ou para se controlar o diâmetro do congelamento. Para tanto, recorre-se aos cones de neoprene ou daqueles de otoscópios. Denomina-se, finalmente, sistema fechado quando se recorre a cones fechados, em uma das extremidades. Há circulação contínua do nitrogênio sendo que o excesso sai por um ladrão apenso (MAIA; RIBEIRO, 1997; LUCAS; LARSSON, 2001). Pode haver um maior número de insucessos quando do emprego do spray, relativamente aquele das sondas fechadas, devendo ser utilizado por profissionais mais experientes, pois o congelamento pode não oferecer um controle preciso do diâmetro do halo. Profissionais inexperientes devem treinar previamente em cadáveres antes de se utilizar deste equipamento (WITHROW et al, 1975; HOYT, JR.; SEIM III, 1981; SEIM III; HOYT, 1982; WITHROW, 1989; KORPAN; ZHARKOV, 2001).

Sondas: estas são feitas de metal, excelentes condutores térmicos, por dentro das quais circula o nitrogênio líquido, congelando a extremidade da sonda, que entrará em contato com a

lesão. É tido como o meio mais seguro de aplicação do nitrogênio, porém é menos eficaz que o spray (SEIM III; HOYT JR., 1982). Podem ter superfície plana, arredondadas, convexas e até pontiagudas. A superfície de contato entre a sonda e a lesão será mais efetiva, quando se exerce uma compressão e, também, quando do uso de gel ou vaselina aplicados previamente na lesão (KORPAN, 2001; KORPAN; ZHARKOV, 2001). Se ocorrer o congelamento da sonda, antes do contato desta com a lesão, formam-se pequenos cristais, devido a umidade do ar. Tais cristais diminuem a capacidade de aderência entre a sonda e o tecido (MARQUES, 1989). Segundo Withrow (1989), a sonda deve ser aposta, ainda em temperatura ambiente, ao tecido, iniciando-se, então, o congelamento da mesma. Haverá a chamada crioadesão, que se dá por volta de 0°C. Quando houver interrupção da aderência, deve-se interromper o procedimento e se reiniciar o processo. Quando o halo de congelamento desejado é atingido, aguarda-se que a sonda se desprenda para que não haja injúria tecidual por avulsão (WITHROW, 1989; KORPAN, 2001). A presença de sangue, serosidade ou solução de continuidade, recém induzida, por biópsia, são excelentes meios para uma melhor crioadesão (LANE, 1974b; SEIM III; HOYT, 1982). Korpan (2001) utilizou em seus procedimentos, gel lubrificante, para que a crioadesão fosse maior. Marques (1989) sugeriu, para desfazer a aderência entre a sonda e o tecido congelado, a interposição de movimentos circulares com a sonda.

Quando se depara com lesões localizadas por sobre importantes estruturas (a exemplo do globo ocular e de vasos sanguíneos) se utiliza, também da crioaderência, para tracionar o tecido, afastando-o, assim, de tais estruturas e, conseqüentemente, lesando apenas a área de tecido alvo sem promover crionecroses desnecessárias (DAWBER, 2001).

Derramamento direto do criógeno: A aplicação direta do nitrogênio em lesões ou neoformações é esporadicamente utilizada. Há, porém o risco de disseminação do criógeno, podendo lesar grandes áreas de tecidos até então sãos. Deve, portanto, ser usado com muito critério e em continentes que, praticamente, tenham o mesmo diâmetro da lesão. Pode-se usar a vaselina para agir como isolante, impedindo assim que o nitrogênio líquido se disperse (GREINER

et al, 1975).

Independentemente da forma de se proceder a crioterapia, quando se evidenciam lesões de grandes dimensões, recomenda-se prévia exérese da maior quantidade de tecido lesado possível ou a plena retirada da lesão pela sua base, denominada barbírese (“shaving”). Com isso haverá menor quantidade de tecido a ser congelado, uma superfície mais homogênea e um menor tempo requerido para o congelamento (BAXTER, 1977; GOLDSTEIN; HESS, 1977; WITHROW, 1980; SEIM III; HOYT, 1982; THAI; SINCLAIR, 1999; DAWBER, 2001; DAWBER, 2002; KUFLIK, 2004).

2.5 Temperatura e tempo do procedimento

À temperatura de no mínimo 20°C negativos, por pelo menos um minuto, todos os tecidos vivos sofrem crionecrose. Porém, quanto mais longo for o período do congelamento, maior será a extensão de área necrosada. Deve-se levar em consideração que se desejam temperaturas mais baixas, em regiões onde não existam estruturas importantes próximas à lesão que se pretende congelar (LANE, 1974a; GOLDSTEIN; HESS, 1977; GREINER et al, 1975; PODKONJAK, 1982b; WITHROW, 1989). Segundo Goldstein e Hess (1976), a temperatura ideal a ser alcançada é de pelo menos 25°C negativos, para que se obtenha crionecrose adequada. Todavia, é muito difícil precisar uma única temperatura como aquela ideal já que o congelamento se dá em distintas temperaturas em função do tecido considerado, mormente em função do teor hídrico, Assim, os osteócitos são destruídos a uma temperatura de 0°C, células do epitélio tegumentar, e das glândulas de mucosas são destruídas a 10°C negativos e, finalmente, os melanócitos são destruídos numa faixa térmica de 3° a 14°C negativos. Já a temperatura requerida para a necrose de células de carcinomas espinocelulares gira em torno de 30°C negativos (GRAHAN, 1983). O dano celular efetivo ocorre somente entre 0°C e 60°C negativos, quando do total congelamento do tecido. Considera-se que a temperatura de 50°C negativos é aquela ideal para tratamento de

neoplasias malignas (MAIA; RIBEIRO, 1997; ZACARIAN, 1985; PIMENTEL, 1997; GILBERT et al., 1997). Trabalhos executados com congelamento, em caráter experimental, de fígado de animais e de culturas celulares *in vitro* têm demonstrado que células neoplásicas de distintas origens têm sua destruição completada entre 38°C e 40°C negativos (KORPAN; ZHARKOV 2001; SEIFERT et al., 2003; ESCUDERO et al., 2003; RUBINSKY et al., 1995). Todos os autores retrocitados afirmaram, em consenso, que temperaturas abaixo de 60°C negativos, não propiciariam um aumento no dano celular.

2.6 Ciclos de congelamento-descongelamento

Quanto mais rápido for o congelamento, mais intenso será o grau de crionecrose e quanto mais lento for o descongelamento, por sua vez, maior será a morte celular. Já um congelamento lento seguido de descongelamento rápido irá reduzir a crionecrose (LANE, 1974a; GREINER et al, 1975; GOLDSTEIN; HESS, 1977; SEIM III, 1980; PODKONJAK, 1982B; WITHROW, 1989). Se houver o descongelamento lento, não haverá possibilidade de restabelecimento do equilíbrio entre os meios intra e extracelular. Baseando-se nesses dados, pode-se, em caso de congelamento accidental de tecidos hígidos, provocar um descongelamento rápido impedindo ou até diminuindo a destruição tecidual indesejada (PODKONJAK, 1982b). Greiner et al (1975), consideraram como duração ideal de descongelamento aquele de 20 a 30 minutos. Saxe e McDonald (1976), conceituaram como congelamento rápido e descongelamento lento, respectivamente, aqueles com rebaixamento térmico de 10°C negativos por minuto e incremento da temperatura oscilando entre 1 e 10°C, também, na mesma unidade de tempo. Finalmente, segundo Seim III (1980), pode-se considerar o descongelamento como lento quando os tecidos previamente congelados, descongelam de forma natural em recinto à temperatura ambiente, sem qualquer artifício que possam aquecê-los. Segundo Gage e Baust (1998), a velocidade de congelamento varia num mesmo procedimento, pois a região que está mais próxima da fonte criógena pode ter

variações de aproximadamente 50°C negativos por minuto, enquanto que o tecido a congelar que esteja próximo à periferia perderá a temperatura de forma mais lenta. Aqueles autores chegam a afirmar que a velocidade de troca de temperatura não é o fator mais importante, já que os mecanismos de lesão tecidual serão variáveis, mas igualmente letais. Não há, portanto, uma opinião consensual dos autores sobre o que são congelamentos: rápido, moderadamente rápido e extremamente rápido. Na prática, quando o nitrogênio líquido é utilizado, o congelamento propiciado por este criógeno é considerado rápido.

O tempo que o tecido deve manter-se congelado é igualmente discutido por vários autores. Pode variar de 30 segundos a 20 minutos. Quando os procedimentos estão relacionados a tratamentos de dermatopatias, neoplásicas, hiperplásicas e degenerativas raramente os tempos ultrapassam 90 segundos (PIMENTEL, 1997; THAI; SINCLAIR, 1999; DAWBER 2001, LUCAS; LARSSON, 2001; DAWBER, 2002; CASTRO et al., 2003; KUFLIK, 2004). Porém, para o tratamento de neoplasias em órgãos internos, como fígado, pâncreas, próstata e ossos, os tempos necessários para o congelamento podem variar de 5 a 40 minutos (SILVERMAN et al., 2000; KORPAN; ZHARKOV, 2001; KORPAN, 2001; ROBINSON et al., 2001);

Como regra prática, embora não muito clara, para o tratamento de lesões dermatológicas (MAIA; RIBEIRO, 1997, THAI; SINCLAIR, 1999; KUFLIK, 2004; DAWBER, 2001; DAWBER, 2002) recomenda-se que: “para cada tipo de lesão e doença envolvida, deve-se ter um tempo específico de congelamento”. Sugere-se, ainda, (MAIA; RIBEIRO, 1997; DAWBER, 2002) que em uma lesão que deva ser congelada por 60 segundo, o tempo pode ser dividido da seguinte maneira: de 10-15 segundos para se atingir o halo desejado e nos 45 a 50 segundos restantes manter o halo de congelamento. Da mesma maneira, para se determinar o tempo ideal de descongelamento total, sugere-se que este deve ser igual ou maior a duas vezes o tempo de congelamento total ($TDT \geq 2.TCT$) [(MAIA; RIBEIRO, 1997; THAI; SINCLAIR, 1999; DAWBER 2001; DAWBER, 2002; KUFLIK, 2004)].

2.7 Número de aplicações

Genericamente, se considera que dois ciclos de congelamento-descongelamento se fazem necessários para que se obtenha uma maior taxa de morte celular, pois há uma maior condutividade térmica em tecidos previamente congelados. Ocorre sempre um aumento no tempo total necessário para o descongelamento naqueles tecidos submetidos a mais de um ciclo, por haver maior quantidade de água disponível, provenientes das células destruídas no primeiro ciclo. Ainda, pelo fato de haver uma maior condutividade, haverá um maior congelamento das células localizadas na periferia da lesão. (LANE, 1974b; GOLDSTEIN; HESS, 1977; SEIM III, 1980; GAGE; BAUST, 1998; HOFFMANN; BISCHOF, 2002). Ainda mais, Podkonjak (1982b), afirmou que um segundo ciclo é bem mais letal para as células, o que pode ser muito benéfico em caso de tratamento de neoplasias malignas. Porém, em regiões em que não se deseja a formação de cicatrizes, ou naquelas onde não deva haver grandes perdas teciduais, este segundo ciclo deve ser utilizado com extremo critério. No clássico estudo de Gage (1978), em que pálato de cães foram congelados, com diferentes tempos, temperaturas e número de ciclos, ficou estabelecido que um único ciclo de congelamento, de curta duração e com temperaturas mais altas reduzem a extensão da injúria em comparação àqueles procedimentos de vários ciclos, de duração maior e com menores temperaturas.

Portanto, para se destruir um tecido, através da crioterapia, deve-se submetê-lo a vários ciclos de congelamento e descongelamento, aumentando assim a possibilidade de êxito. (MARQUES, 1989). Comprovou-se, que uma suspensão de células neoplásicas inoculadas em camundongos, após ser submetida a um ciclo de congelamento-descongelamento, era capaz de induzir neoplasias em 34% dos animais, contrariamente ao que fora observado quando da inoculação do material submetido a três ciclos, já que, neste último caso, não houve indução do blastoma (NELL, 1971). Mais recentemente, mesmo em crioterapias de próstatas, onde o congelamento pode durar mais de 20 minutos, o segundo ciclo é igualmente preconizado (SILVERMAN et al., 2000; KORPAN; ZHARKOV, 2001; KORPAN, 2001; ROBINSON et al., 2001)

Como regra geral preconiza-se: em casos onde há a possibilidade de realização de crioterapia sem o risco de perda de estruturas vitais ou, ainda, em neoplasias malignas, devem-se realizar dois ciclos ou mais de congelamento-descongelamento sendo que, em lesões benignas realizam-se tão somente dois ciclos. Recomenda-se, que se evite o uso de um único ciclo, pois este procedimento diminui em muito a taxa de morte celular (LANE, 1974a; GREINER et al, 1975; WITHROW et al, 1975; SAXE; Mc DONALD, 1976; GOLDESTEN; HESS, 1976; GOLDSTEIN; HESS, 1977; SEIM III, 1980, MARQUES, 1989). Withrow (1989) é enfático ao afirmar que existem poucas diferenças, no que se refere à morte celular, quando se utiliza mais de três ciclos. A maioria dos autores utiliza-se de dois ciclos tanto em lesões benignas como malignas (MARQUES, 1989; LUCAS; LARSSON, 2001; THAI; SINCLAIR, 1999; DAWBER, 2001; DAWBER, 2002; KUFLIK, 2004).

2.8 Indicações

Face ao seu caráter destrutivo, a crioterapia tem sido utilizada para o tratamento de diferentes enfermidades de sistemas ou órgãos. Historicamente, há uma maior indicação no sistema tegumentar, devido a grande facilidade de aplicação por equipamentos e métodos simples. Dawber (2001, 2002), em seus artigos, indica o procedimento para mais de sessenta tipos de lesões dermatológicas inflamatórias ou neoplásicas, além de mais de 15 indicações para neoplasias malignas. Tais observações são corroboradas por Kuflik (2004), que, por sua vez, indica a crioablação em mais de 40 tipos de dermatopatias. Todos os autores que se utilizam desta metodologia de tratamento relatam o grande êxito em termos de resultados, tal como Kuflik (2004) que, em seu levantamento de mais de 7000 pacientes com lesões neoplásicas malignas criotratadas, obteve 98,6% de cura. No contexto da medicina veterinária a crioterapia, igualmente, tem maiores possibilidades de emprego na dermatologia. Sobre este fato, verificado em todas as latitudes, vários são os trabalhos enfocando a terapia pelo frio, em quadros de:

dermatoviroses, granulomas, piodemites, hiperplasias e cistos, fístulas, flogoses, protozooses e neoplasias benignas ou malignas (LANE, 1974a; FARRIS et al, 1975; GREINER et al, 1975; WITHROW et al, 1975; GOLDESTINE; HESS, 1976; KRAHWINKEL, 1976; FARRIS et al, 1976; GOLDESTINE; HESS, 1977; NORSWORTHY et al, 1977; BOJRAB, 1978; LISKA e WITHROW, 1978; HOLMBERG, 1980; KRAHWINKEL, 1980; PODKONJAK, 1982b; WITHROW, 1982; GOURLEY, 1985; GIANNONE, 1985; ROBERTS et al, 1986; MACY; MACEWEN, 1989; MARQUES, 1989; WITHROW, 1989; CLARKE, 1991; KIRPENSTEIJN, 1993; BURLEY, 1995; OGILVIE, 1995; SHIBATA et al., 2002; LUCAS; LARSSON, 2001; NANDI et al., 2002).

Contudo, com o avanço tecnológico houve o grande desenvolvimento da aplicação desta modalidade terapêutica em diferentes neoplasias, tanto em medicina veterinária como na medicina humana, de outros órgãos tais como a próstata, fígado, pâncreas, pulmão, linfonodos, bem como de diferentes tecidos (ósseo e nervoso), além do tratamento de casos recidivantes ou avançados de neoplasias genitais e da glândula mamária (KALBHEN et al., 1998; POPKEN et al., 2000; HOFFMANN; BISCHOF., 2002; DABAK et al., 2003; BUTTS et al., 2003; ESCUDERO et al., 2003).

2.9 Fatores relativos às lesões do paciente

Deve-se levar em consideração, antes de se iniciar o procedimento crioterápico, algumas variantes, tais como: superfície e configuração, composição celular predominante, volume da lesão e suprimento sanguíneo; que podem influenciar tanto na escolha da técnica de aplicação como também na temperatura que se deva atingir nos tecidos a serem tratados.

Superfície e configuração da lesão: a importância da superfície de contato e da configuração de uma lesão pode ser demonstrada congelando-se a porção floral da secção de uma couve-flor pelo contato com uma barra de metal congelada (semelhante a uma sonda fechada). Haverá o congelamento apenas da região em contato com o metal, não havendo o congelamento das regiões irregulares circunvizinhas. Porém, se houver a aposição de um gel aquoso solúvel na superfície do vegetal haverá um contato maior com o metal, pois além de tornar sua superfície mais regular, aumentar-se-a a área de congelamento da referida porção. Com este prático exemplo, nota-se a importância, também, da seleção dos métodos de aplicação, que serão apresentados a seguir (LANE, 1974b; PODKONJAK, 1982b).

Tipo celular predominante

Tecidos com grande quantidade de água são mais susceptíveis ao frio que aqueles com menores teores (tendões e ossos). Tal consideração deve ser lembrada quando se analisa a natureza de uma lesão que será submetida à crioterapia (PODKONJAK, 1982b; GAGE; BAUST, 1998; KORPAN, 200; HOFFMANN; BISCHOF, 2002). Cada tipo de célula tem uma determinada capacidade de resposta ao frio (MARQUES, 1989), o que torna difícil a padronização de temperaturas para o congelamento de tecidos. Quando células de tecido conjuntivo, rico em fibras colágenas, são submetidas à crioterapia, pode-se observar que estas permanecem quase que inalteradas, propiciando boa cicatrização e manutenção da arquitetura da região sob tratamento. Tal fato leva a indicação do procedimento crioterápico, naquelas regiões onde outras condutas poderiam provocar estenose (a exemplo do ânus e cérvix). Não está, contudo, totalmente esclarecido, quais seriam os danos sofridos pelo colágeno durante o congelamento. Porém, pelos conhecimentos atuais, estes parecem ser menores que aqueles provocados por uma queimadura. O princípio proposto, inicialmente, por Langer, segundo o qual a cicatriz dependeria do grau de lesão do colágeno, pode sugerir que na crioterapia, o fator responsável por cicatrizes de boa qualidade, seja o de haver, em menor escala, lesões das fibras colágenas (MARQUES, 1989). A recuperação dos nervos, submetidos ao congelamento, tem sido objeto de

inúmeros estudos. Brown et al. (1975), avaliaram, experimentalmente, este aspecto, congelando o nervo ciático de coelhos diretamente com nitrogênio líquido. Em todos os casos, a condução nervosa foi totalmente interrompida, porém, após 100 dias houve total normalização da função.

A crioterapia é, freqüentemente, acompanhada por uma sensação de queimadura. Destarte, se uma mesma área for submetida a crioterapia, após alguns dias, observar-se-á pouca ou, mesmo, nenhuma sensação de ardência. Experimentos realizados (DAWBER, 1988) comprovaram que, ao se submeter pacientes humanos à crioterapia, as sensibilidades dolorosa, tátil e térmica seriam diminuídas ou mesmo inexistiriam, e a recuperação total destas sensações se daria após um a cinco anos. Estes fatos propiciaram a utilização do congelamento em crioanalgesia. Zhou et al. (2003) conseguiram a analgesia induzida pelo frio em pacientes humanos no decorrer de 56 meses após o congelamento do ramo espinal posterior.

Os melanócitos são muito sensíveis a curtos períodos de congelamento com nitrogênio líquido, isto resulta em prolongadas alterações na cor da pele. Tais células são aquelas mais sensíveis ao frio, seguidas, em ordem decrescente de sensibilidade, por aquelas de tecidos com alta celularidade, por células epiteliais, do estroma fibroso, das grandes artérias, dos nervos, de cartilagens e do tecido ósseo. Sabe-se, ainda, (SEIM III, 1980) que os tecidos neoplásicos possuem muito mais água que os somáticos, ditos normais. Na prática, pode-se, com exceção do ósseo, considerar que tecidos vivos, de animais, têm propriedades térmicas constantes (GOLDSTEIN; HESS, 1977; PODKONJAK, 1982b). Porém com o avanço de diferentes técnicas, mesmo o tecido ósseo têm sido submetido, com graus variados de sucesso, aos procedimentos de tratamento de neoplasias pelo frio (SILVERMAN et al., 2000; KORPAN, 2001)

Volume lesional : O tamanho da lesão, a ser submetida à crioterapia, deve ser considerado quando se seleciona o tipo de técnica a ser empregada, porém em diferentes tecidos e regiões anatômicas, todo o volume que se deseja destruir, deve estar contido na massa de gelo que irá se formar (LANE, 1974a; WITHROW et al, 1975; SAXE e Mc DONALD, 1976; GOLDESTEIN; HESS, 1976; GOLDSTEIN; HESS, 1977; MARQUES, 1989; THAI; SINCLAIR, 1999;

DAWBER 2001, LUCAS; LARSSON, 2001; DAWBER, 2002; SILVERMAN et al., 2000; KORPAN; ZHARKOV, 2001; KORPAN, 2001; ROBINSON et al., 2001).

Suprimento sanguíneo : Já é sabido, de há muito, que o sucesso do procedimento crioterápico, é maior quando de um congelamento rápido sucedido pelo descongelamento lento, sendo assim, regiões ou neoplasias que tenham grande aporte sanguíneo, que se localizem próximos aos grandes vasos, apresentam um congelamento mais lento e um descongelamento muito mais rápido. Frente a tal consideração, devem-se aplicar torniquetes, nestas regiões, para que se tenha um maior êxito no procedimento. Substâncias vasoconstritoras, a exemplo da adrenalina, ou a prévia balonização também podem ser utilizadas. Em casos extremos pode-se recorrer à ligadura dos vasos envolvidos no aporte sanguíneo da neoplasia (GOLDSTEIN; HESS, 1977; SEIM III, 1980; PODKONJAK, 1982b; KORPAN, 2001).

Após todas estas considerações, deve-se abordar a formação da chamada “calota esférica de gelo”, que é obtida quando da realização da crioterapia.

A grande maioria dos autores considera que o congelamento, através do spray, é o método mais rápido, mais destrutivo e letal para o tecido alvo, além de ser considerado aquele que atinge a maior profundidade, durante o procedimento criocirúrgico (GREINER et al, 1975; SAXE e McDONALD, 1976; GOLDESTEIN; HESS, 1976; BOJRAB, 1978; BRYNE, 1980; HOYT JR.; SEIM III; 1981; PODKONJAK; 1982b; SEIM III; HOYT JR.; 1982; GOURLEY, 1985; WITHROW, 1989; KORPAN, 2001; DAWBER, 2001). Segundo Maia e Ribeiro (1997), quando se realiza o procedimento de congelamento, tanto por sonda fechada como por spray, fixando-se num único local, observa-se a formação de um halo de gelo, esbranquiçado e geralmente circular, onde a profundidade de congelamento, quando do uso de sonda fechada é igual ao raio deste halo circular. Já, quando do emprego de spray a profundidade seria igual à metade deste mesmo raio. Tal assertiva difere dos demais autores compilados, como Krahwinkel (1980) e Zacarian (1985). Estes referem que, o raio da circunferência criada com o congelamento pelo

spray é a exata medida da profundidade atingida, formando uma hemi-esfera perfeita. Já Marques (1989), deduziu uma fórmula que considera que a profundidade do congelamento é igual a 1,3 multiplicado pela medida que ultrapassa a borda da sonda utilizada para o congelamento, relatando, ainda, que as medidas seriam similares quando do uso do spray. Finalmente, segundo Gage (1992), a profundidade de congelamento quando do emprego da sonda é aproximadamente igual à medida do halo que ultrapassa a sonda. Comparando-se estas assertivas, em uma lesão de 10mm de diâmetro, congelada por uma sonda de um centímetro de diâmetro, que oferece um congelamento de 12mm de diâmetro (2 mm além da sonda), as medidas de profundidade variariam de 2 a 6 mm, medidas muito controversas, mormente se o tratamento for dirigido à uma neoplasia.

Deve-se ressaltar que o halo de congelamento formado tem, em sua periferia, a temperatura de 0°C, e que essa temperatura não é suficiente para acarretar a morte celular. Ao se empregar sondas fechadas, a temperatura mais baixa estará limitada à área de contato direto com a sonda. Sendo que, quanto mais afastada estiver a região congelada da sonda mais elevada será a temperatura (até um limite de 0°C na periferia). Assim sendo, na realidade tão somente dois terços do tecido envolvido no congelamento (visualizado através do halo ou palpado como uma calota esférica de gelo), serão destruídos ou, segundo Withrow (1989), 70 a 80% do tecido congelado será destruído. Baseados nestas assertivas há autores que determinaram as medidas do halo, que devem ultrapassar a lesão, para que se tenha o êxito esperado. Tais medidas variam de três a cinco milímetros, em lesões benignas ou superficiais, e de 5 a 10 mm, em lesões malignas ou profundas, e são denominadas de margem de segurança (WITHROW et al, 1975; MAIA; RIBEIRO, 1997; PIMENTEL, 1997; THAI; SINCLAIR, 1999; DAWBER, 2001; DAWBER, 2002; KUFLIK, 2004). Destaque-se, portanto, que o método visual para a análise da profundidade de congelamento pode gerar uma série de dúvidas. Existindo, para tal avaliação, outros métodos, tais como a palpação que, além do halo, avaliará a profundidade, e a estimativa da profundidade de congelamento pela mensuração da temperatura, com agulhas termosensíveis ligadas a um pirômetro. Duas agulhas devem ser colocadas, a primeira delas superficialmente na transição entre os tecidos alterado e normal, a outra, no ponto mais profundo da lesão, novamente, entre

tecido neoplásico e aquele dito normal (GREINER et al, 1975; WITHROW, 1980; MARQUES, 1989; SEIM III; HOYT JR., 1982; GOURLEY, 1985; KORPAN, 2001). Há, contudo desvantagens, quando do uso destas agulhas, tais como: seu custo, características anatômicas de algumas regiões que impediriam sua utilização, indeterminação de qual região da agulha transmite a informação para o sensor e se, realmente, é possível colocá-la no ponto mais profundo da lesão, uma vez que este ponto nem sempre é fácil de estimar (PODKONJAK, 1982). Todas as variáveis e os conflitos de conceitos dos autores consultados, podem levar à uma subestimativa da profundidade de congelamento e, conseqüentemente, explicar a diferença de índices de êxito e de falha obtidos, dispostos na bibliografia, para o tratamento das mesmas enfermidades. Segundo Traoré et al. (2003), a crioterapia sem o acompanhamento destas variáveis, pode provocar muitas falhas terapêuticas.

Zacarian (1985), foi o autor que mais tentativas executou visando, estabelecer tais critérios. Em seu clássico esquema (Figura 1), obtido através de experimentos em pele de cão e de cálculos matemáticos, este autor descreveu com precisão as alterações de temperatura ocorridas durante um congelamento em tecidos vivos.

Porém este mesmo autor, que foi um dos pioneiros nas medições de neoplasias cutâneas através da utilização da ultra-sonografia, não logrou êxito em medir tais neoplasias submetidas ao congelamento, não conseguindo observar a formação da calota de gelo solidificada pela formação de “sombra acústica”, oferecida por esta técnica de imagem. Zacarian delegou tal missão à futura evolução tecnológica (SIC), postulou, ainda, algumas diretrizes que permitissem a avaliação do congelamento tecidual:

- determinar precisamente a profundidade e extensão da neoplasia
- diferenciar o crescimento neoplásico de estruturas circunvizinhas
- visualizar o avanço da calota esférica de gelo quando da realização de crioterapia
- mensurar o volume exato da crionecrose oferecida pela crioterapia

Com estas diretrizes Zacarian acreditava que as determinações do congelamento pela imagem seriam conquistas de grande aplicabilidade na técnica da crioterapia, aumentando a precisão terapêutica e os índices de sucesso. Praticamente oito anos após as observações de Zacarian (1985), surgiram os primeiros trabalhos relacionados à captação de imagens de propagação de congelamento. Laugier e Berger (1993), acompanharam o congelamento de pele *in vitro* por ultra-sonografia (modo M) e comprovam que é possível avaliar o congelamento por técnicas de imagem.

Rubinsky et al. (1995) monitoraram o congelamento de pele de coelhos por ressonância magnética. Este mesmo grupo de autores (GILBERT et al., 1997), desenvolvem trabalho similar acompanhando o congelamento de fígado, após a exposição deste órgão por laparotomia. Com o desenvolvimento crescente dos equipamentos, destinados ao diagnóstico por imagem, muitos trabalhos similares surgiram, utilizando-se das técnicas de ultra-sonografia, tomografia computadorizada e ressonância magnética na elucidação dos padrões de propagação tecidual do frio (SANDISON et al., 1998; DANIEL et al., 1999; TACKE et al., 1999; LEE JR. et al., 1999; SILVERMAN et al., 2000; YANG et al., 2000; KUSZYK et al., 2000; GRANOV et al., 2001; WEI et al., 2002; SALIKEN et al., 2002; BUTTS et al., 2003; TRAORÉ et al., 2003; MALA et al., 2003; ESCUDERO et al., 2003; FOURNIAL, 2004).

Dentre as possibilidades de captação de imagens, algumas variantes podem ser levadas em consideração, tais como: preço e disponibilidade de equipamento, além da experiência profissional. A ultra-sonografia possibilita uma imagem em tempo real, e pode acompanhar o congelamento de neoplasias em diferentes órgãos. Existe, ainda, a possibilidade de uso intraoperatório desta técnica. Entretanto seu grande inconveniente é a formação de sombra acústica em concreções sólidas. Quando um tecido é congelado a esfera de gelo formada é sonograficamente semelhante a qualquer outra estrutura pétreo, impossibilitando a avaliação precisa das margens de congelamento entre o tecido neoplásico e o tecido desprovido da doença (TACKE et al., 1999; LEE JR. et al., 1999; SILVERMAN et al., 2000; KUSZYK et al., 2000; SALIKEN et al., 2002; WEI et al., 2002). Segundo Granov et al. (2001), o uso da untra-sonogafia pode falhar em 10% dos casos de acompanhamento da crioablação.

As técnicas mais adequadas para o acompanhamento de uma crioablação são a tomografia computadorizada e a ressonância magnética. Alguns autores defendem o uso da ressonância magnética, pela precisão na formação de imagens e por esta técnica permitir, ainda, a avaliação da temperatura tecidual, com um modelo matemático ligado ao computador (SILVERMAN et al., 2000; SALIKEN et al., 2002). Mas há aqueles que preferem o uso da tomografia, pois é um equipamento mais difundido e viável nos centros de diagnóstico, além de permitir que o exame seja realizado sem alterar os equipamentos crioterápicos, que devem ser adaptados para que possam ser utilizados com acompanhamento de ressonância, frente aos artefatos criados pelo metal (LEE JR. et al., 1999; WEI et al., 2002) ou ainda por diferenças na condutividade térmica nas proximidades de grandes vasos (RABIN, 2003). Estes mesmos autores destacaram ainda a viabilidade de utilização desta técnica tanto para o diagnóstico, como para o acompanhamento da criocirurgia em um único aparelho. Agrupando opiniões Kuszyk et al. (2000) relataram que o uso combinado destas técnicas levaria a um êxito maior, pois em órgãos internos o posicionamento não invasivo do equipamento crioterápico seria mais rápido e dinâmico, com o acompanhamento por ultra-sonografia e a avaliação da evolução do congelamento, seria mais precisamente dada pelos outros dois métodos.

A tomografia computadorizada é um método de diagnóstico que apresenta uma alta resolução de imagens e pode identificar alterações estruturais de densidade em tecidos moles e ósseos, através da análise de imagens sequenciais. Utilizam-se os raios X, como na radiografia convencional, que são emitidos por um tubo gerador e captados por detectores em cada um dos 360° de movimentação de ambos ao redor do paciente, sendo as informações adquiridas e analisadas por um computador (Figura 2 – sala de operações). Podem ser obtidas imagens em corte transversal, dorsal e sagital. Comparado à radiografia convencional, que discrimina tecidos com diferença de densidade de 5%, a tomografia pode distinguir diferenças de menos de 1%. Como resultado, poderiam ser observadas alterações ou estruturas que não podem ser avaliadas pela radiografia convencional. Baseada na teoria de Hounsfield, que se baseia no fato de que todos os raios que atravessam o corpo contém informação de toda a matéria atravessada pelo feixe de

radiação, a tomografia pode dar informações precisas e muito distintas permitindo análises de imagens de diferentes órgãos sem sobreposições de imagens, uma vez que o aparelho gira completamente (360°) ao redor do paciente. A obtenção de imagem é quase imediata e com os aparelhos atuais evidencia-se em menos de 5 segundos (OWENS; BIERLY, 1999; LEE JR. et al., 1999; WEI et al., 2002).

O equipamento produz um feixe de radiação que atravessa as estruturas a serem estudadas, tais estruturas absorvem uma certa quantidade de energia semelhante ao seu coeficiente de atenuação. A energia, que emerge ao atravessar o paciente, proporciona o sinal que será captado pelos detectores opostos em foco com a fonte de radiação. A diferença energética entre radiação primária e radiação atenuada possibilita a medição dos coeficientes lineares de atenuação dos diferentes tecidos atravessados e, acoplado a um sistema computadorizado ocorre a análise e construção da imagem. O computador, por uma série de cálculos matemáticos transforma o sinal transmitido pelos detectores em imagem, demonstrada no monitor. Para a formação de tal imagem, se utiliza uma unidade básica denominada de voxel.

Cada voxel, que compõe um corte, possui uma absorção característica, que é representada no monitor como uma imagem bidimensional denominada pixel. De acordo com o valor de atenuação dos raios, recebe este um valor numérico, ao qual se atribui um tom de cinza (“Gray-scale”) na composição da imagem na tela do computador. Disposto no lado direito desta tela está a escala com distintas nuances de tonalidade, do branco ao preto, com um tom mais escuro por centímetro (Figura 3). O computador processa os coeficientes de atenuação relativos a cada voxel e os compara a materiais de referência (a água é indicada como valor zero, em uma escala que varia de -1000 para o ar, representado em preto, e de até $+1000$ para o osso, representado em branco) de forma semelhante a uma radiografia convencional, sendo, porém, possível determinar a espessura de cada secção, recurso não permitido pelo método tradicional. As unidades dos valores de radiodensidade são denominadas Unidades Hounsfield (UH), em referência ao criador do método (OWENS e BIERLY, 1999).

Antes da realização do exame propriamente dito, é necessária a realização do topograma

ou “scout”, que consiste em uma radiografia digitalizada prévia do paciente, para que posteriormente seja definida a região a ser submetida à tomografia, determinando-se, ainda, a espessura dos cortes, que podem variar de 1 a 10 milímetros e os planos analisados.

Apesar dos grandes avanços assinalados, referidos na bibliografia compilada, poucos são os trabalhos que correlacionam as medidas obtidas no congelamento (diâmetro e volume) de distintos tecidos de diferentes espécies, com aquelas obtidas no exame histopatológico do tecido crionecrosado (GILBERT et al., 1997; LEE JR. et al., 1999; SILVERMAN et al., 2000; GRANOV et al., 2001; MALA et al., 2003).

Entretanto não há, nas bibliografias nacional ou internacional relatos de utilização experimental da tomografia computadorizada para avaliação e mensuração de diferentes técnicas de aplicação do nitrogênio líquido em pele de cães hígidos *in vivo*, bem como sua correlação com a necrose obtida, igualmente avaliada e mensurada pela histopatologia.

Figura 1 - Gradientes de temperatura obtidos pela aplicação de Nitrogênio Líquido – spray, em relação à profundidade de congelamento, Zacarian, 1985, p.5

Figura 2 (A) – Tomógrafo - Tomoscan / Philips.

Figura 2 (B) - Sala de captação computadorizada de imagens.

Figura 3 - Tomografia de membro torácico de cão Beagle submetido a crioterapia pelo método do derramamento.

3 Objetivos

Baseado nos fatos adrede expostos, o presente trabalho visa mensurar variantes envolvidas no congelamento cutâneo de cães hígidos submetidos à crioterapia pelo nitrogênio líquido e tem como objetivos:

- Avaliar a viabilidade do acompanhamento de congelamento cutâneo em cães *in vivo* por diferentes técnicas de crioterapia, pelas mensurações do halo e da profundidade, através da tomografia computadorizada.
- Correlacionar as medidas do raio e da profundidade do congelamento, obtidas através da tomografia computadorizada, após a aplicação do nitrogênio líquido, em pele de cães *in vivo*, pelas técnicas da sonda fechada, derramamento e spray (com distintos tempos de congelamento).
- Correlatar as medidas do raio e da profundidade da necrose causada por aplicação do nitrogênio líquido em pele de cães *in vivo*, pela técnica da sonda fechada, derramamento e spray (com distintos tempos de congelamento), obtidas através do anatomopatológico microscópico.
- Correlacionar as medidas do diâmetro, raio e profundidade, bem como o volume do congelamento com aquelas da necrose.
- Observar, através de todas as mensurações, dentre os métodos avaliados, aquele menos eficiente, pela destruição tecidual oferecida comparando as relações entre diâmetros de congelamento e profundidade de necrose.

- Avaliar a possibilidade de se propor um protocolo terapêutico, pré determinando-se a profundidade da lesão em função do método de aplicação escolhido.

4 Material e Métodos

Foram utilizados vinte animais, da espécie canina, com 12 a 18 meses de idade, sendo 12 machos e oito fêmeas, raça Beagle, linhagem UNITOX (UNISA/SP). O experimento foi realizado em três fases, sempre com o emprego do aparelho Cry-AC® (Brimill Co) e com o uso do nitrogênio líquido, como criógeno:

4.1 Avaliação do congelamento

a. Os animais foram submetidos à prévia sedação com associação de 0,1 mg por quilograma de peso de acepromazina¹ e 4mg/kg de meperidina². Após 10 minutos os animais eram submetidos a cateterização de veia radial e submetidos a anestesia geral, por infusão contínua de thiopental sódico³ e, posteriormente, levados ao aparelho de tomografia computadorizada (Tomoscan A.V – Helicoidal / Philips), onde era realizada a radiografia digital (“scout”) da face lateral de ambos os membros torácicos, para a escolha de uma região homogênea de pele, subcutâneo e musculatura, para que todas as técnicas de crioterapia fossem realizadas nas mesmas condições. As imagens tomográficas foram obtidas com técnica de: espessura do corte de 1,5mm, 220 mA, 130 kV, com matrix 320x320.

b. A pele era então, tricotomizada e submetida à marcação com caneta dermatográfica para estipulação dos pontos de aplicação bem como eram determinadas, por paquímetro digital, dois segmentos de 20mm de extensão em cada um dos membros torácicos (Figura 4).

¹ Acepran® / ²Dolantina® / ³Thiopental®

c. Após tricotomia e marcação dos segmentos, o ponto central era determinado pela aplicação de agulha hipodérmica, (20x7 – BD – Figura 5). A localização desta agulha era marcada pelo técnico, proporcionando assim que a tomografia realizada, após cada procedimento de congelamento, incidisse exatamente neste ponto central.

d. Foram utilizadas quatro técnicas diferentes de crioterapia:

I. Spray I – o spray foi aplicado continuamente em um ponto fixo, até que se visualizasse o halo de 20mm de diâmetro, que ocorreria em no máximo 15 segundos, posteriormente o spray foi aplicado intermitentemente, por mais 60 segundos, de modo que o halo não ultrapassasse os 20mm de diâmetro (Figura 6).

II. Spray II – o spray foi aplicado continuamente em um ponto fixo, até que se visualizasse o halo de 20mm de diâmetro, que ocorreria em no máximo 15 segundos. Posteriormente o spray foi aplicado intermitentemente, por mais 120 segundos de modo que o halo não ultrapassasse os 20mm de diâmetro.

III. Sonda fechada – a sonda metálica de 17mm de diâmetro foi congelada antes de ser aplicada por sobre a pele. Posteriormente, foi posta em contato com o tegumento do cão e assim era mantida até completar 75 segundos de contato, oferecendo um congelamento de 20mm de diâmetro (Figura 7).

IV. Derramamento – com o auxílio da interposição de cone de otoscópio (17mm de diâmetro na extremidade distal), o nitrogênio foi derramado diretamente na pele, em pequenas quantidades, sem que houvesse extravasamento lateral, por 75 segundos, evitando-se que o diâmetro ultrapasse 20mm (Figura 8).

e. Durante os 5 segundos finais, de cada um dos procedimentos, o técnico que operava o tomógrafo, era avisado e se iniciava a operação que levava aproximados 5 segundos para o disparo do aparelho, que por precaução era executado na ausência do profissional. A secção das imagens foi programada para incidir perpendicular

mente no centro do círculo, formado pelo congelamento, determinando-se previamente com auxílio de agulha (20x7) posicionada no ponto central (Figura 5).

f. Todos os procedimentos foram repetidos (2 ciclos), para que fossem possíveis as demais avaliações.

4.2 Avaliação da crionecrose

a. Decorridas 96 horas da crioterapia, os animais eram submetidos à sedação, com associação de 0,1 mg/kg de acepromazina⁴ e 4mg/kg de meperidina⁵. Após 10 minutos os animais eram submetidos à cateterização de veia radial e, a seguir, submetidos à indução anestésica com 5mg/kg de propofol⁶ e, posteriormente, submetidos a intubação endotraqueal, onde se mantiveram anestesiados por gás halotano⁷. Os animais eram então submetidos a exérese cirúrgica, “em fuso”, das áreas necrosadas, com auxílio de bisturi e, subsequente, apunha-se sutura da ferida cirúrgica provocada (Figuras 9 e 10). O material colhido, foi fixado em formol a 10% e, posteriormente prepararam-se lâminas, obtidas a partir de cortes no ponto central da necrose circunscrita, para análise histopatológica, e realização das mensurações de profundidade máxima e estimativa do volume da necrose tecidual, instalada após o procedimento crioterápico.

b. A área de necrose foi avaliada, microscopicamente, de forma detalhada para observação das características morfológicas das células e constatação da morte celular, visualizando-se a transição entre queratinócitos íntegros e necrosados (diâmetro) e aquela das fibras musculares íntegras e necrosadas (profundidade). Após a

⁴ Acepran® / ⁵ Dolantina® / ⁶ Diprivan® / ⁷ Fluotane®

demarcação destes pontos de transição, realizava-se a mensuração de profundidade e diâmetro da necrose (Figura 11), além da estimativa do seu volume. As medições foram realizadas com auxílio do microscópio Nikon Eclipse E-800, conectado a um sistema analisador de imagens (Image Pro plus). Os procedimentos foram realizados junto ao Departamento de Patologia (VPT) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

4.3 Cálculo do volume

Partindo-se do volume de uma esfera, proposto pelo clássico tratado de Arquimedes “Sobre a Esfera e o Cilindro”, deduziu-se o volume da calota de gelo (COROMINAS ⁸, 2004), considerando-se os valores de diâmetro e profundidade. Sendo esta fórmula aplicada para o cálculo dos volumes de congelamento e necrose como demonstrado abaixo:

Volume da esfera

$$V_{esf} = \frac{4}{3} \pi R^3$$

Volume da calota esférica

$$V_{cal} = \frac{\pi}{3} h^2 (3R - h)$$

Na calota esférica:

$$R^2 = (R-h)^2 + r^2$$

$$R^2 = R^2 - 2Rh + h^2 + r^2$$

$$h^2 - 2Rh + h^2 = 0$$

$$R = \frac{h^2 + r^2}{2h}$$

Volume da calota esférica

$$V_{cal} = \frac{\pi}{3} h^2 (3R - h)$$

$$V_{cal} = \frac{\pi}{3} h^2 \left[3 \left(\frac{h^2 + r^2}{2h} \right) - h \right]$$

$$V_{cal} = \frac{\pi}{3} h \left[\frac{3h^2 + 3r^2 - 2h^2}{2} \right]$$

$$V_{cal} = \frac{\pi}{3} h \left[\frac{h^2 + 3r^2}{2} \right]$$

$$V_{cal} = \frac{\pi}{6} h (h^2 + 3r^2)$$

onde:

r - raio

h - profundidade

⁸ Ricardo Corominas, Engenheiro Eletricista - CREA 5060107332/D - Air Waves.

4.4 Análise dos resultados

a. Foram correlacionados os dados obtidos nas medidas da formação da calota esférica de gelo acompanhadas pela tomografia computadorizada, com as medidas de necrose celular observadas ao histopatológico, para comparação entre as técnicas.

Para tal, os seguintes parâmetros foram mensurados:

Di	Diâmetro inicial - Diâmetro congelado (mm)
hi	Profundidade inicial - Profundidade congelada (mm)
hi / ri (%)	Profundidade congelada em relação ao raio de congelamento
Vi	Volume congelado (em milímetros cúbicos)
Df	Diâmetro final - Diâmetro da necrose (mm)
hf	Profundidade final - Profundidade da necrose (mm)
hf / rf (%)	Profundidade da necrose em relação ao raio da necrose
Vf	Volume da necrose (em milímetros cúbicos)
Vf / Vi (%)	Volume da necrose em relação ao volume congelado
hf / Di (%)	Profundidade da necrose em relação ao diâmetro congelado
Df / Di (%)	Diâmetro da necrose em relação ao diâmetro congelado
hf / hi (%)	Profundidade da necrose em relação à profundidade congelada

b. Tais parâmetros foram utilizados para comparar do ponto de vista estatístico os quatro métodos de aplicação do nitrogênio, quais sejam: spray I e II, sonda e derramamento, avaliando as seguintes relações:

1. profundidade do congelamento em relação ao seu raio
2. profundidade da necrose em relação ao seu raio;
3. o volume do congelamento em relação ao volume da necrose;
4. o diâmetro da necrose em relação ao diâmetro do congelamento;
5. a profundidade da necrose em relação à profundidade do congelamento;
6. a profundidade da necrose em relação ao diâmetro do congelamento.

Por este estudo se tratar de uma análise de variáveis quantitativas, utilizou-se das médias e medianas, para resumir as informações, e dos desvios-padrão, erros padrão, mínimo e máximo, para indicar a variabilidade dos dados. Houve interesse em comparar os resultados médios de diversas características, observadas nas quatro técnicas (derramamento, sonda, spray I, spray II). Desta forma o teste estatístico utilizado para realizar as comparações foi a Análise de Variância (ANOVA) com Medidas Repetidas (univariada), pois as observações são relativas a um mesmo animal. Quando houve diferença significativa entre os itens de um fator, para a identificação de quais destes itens apresentavam diferenças entre si foram feitas comparações múltiplas de efeitos principais, utilizando o teste de Bonferroni, apresentados nas tabelas 5,6,7,8,10 e 12, apontando a diferença, quando $p\text{-valor} < 0,05$.

Figura 4 - Cão, Beagle, sob anestesia geral posicionado em tomógrafo, com marcação de intervalos de 20mm por caneta dermográfica, para realização de crioterapia.

Figura 5 - Agulha evidenciada na tomografia computadorizada, para determinação do ponto central da aplicação do nitrogênio líquido.

Figura 6 - Cão, Beagle, sob anestesia geral posicionado em tomógrafo, sendo submetido a crioterapia, pelo método do spray.

Figura 7 - Cão, Beagle, sob anestesia geral posicionado em tomógrafo, sendo submetido a crioterapia, pelo método da sonda fechada.

Figura 8 - Cão, Beagle, sob anestesia geral posicionado em tomógrafo, sendo submetido a crioterapia, pelo método do derramamento.

Figura 9 - Áreas circunscritas de necrose provocada pela crioterapia em pele de membro torácico de cão da raça Beagle, 96 horas após a procedimento.

Figura 10 - Sutura aplicada em pele de membro torácico de cão da raça Beagle, após a exérese cirúrgica da área de necrose.

Figura 11 - Corte histológico do ponto central da área de necrose provocada pela crioterapia, com marcação dos limites de diâmetro (azul) e profundidade (verde).

5 Resultados

Vinte animais hígidos, de distintas faixas etárias da espécie canina, raça Beagle, linhagem UNITOX (UNISA/SP), sendo 12 machos e oito fêmeas, foram submetidos ao procedimento crioterápico acompanhado por tomografia. Realizaram-se, portanto, 80 tomografias computadorizadas, pois cada cão foi submetido a quatro exames, para o acompanhamento de congelamento por spray I e II, derramamentos e sonda fechada (Figuras 12 à 15). Nesta primeira fase do estudo pôde-se evidenciar a formação da “calota esférica de gelo”, bem como mensurar suas medidas de diâmetro e de profundidade, obteve-se, ainda, a relação entre tais medidas (Tabelas 1 a 4).

Tabela 1 - Mensuração e relação das medidas obtidas por tomografia durante o congelamento imediato e da necrose provocada 96 horas após, por histopatologia em pele de cães da raça Beagle, submetidos a aplicação do nitrogênio líquido pelo derramamento direto (tempo total de 75 segundos). São Paulo, 2004.

cão	Derramamento TOMO			Histo				Comparação				
	Di	hi	hi / ri (%)	Vi	Df	hf	hf / rf (%)	Vf	Vf / Vi (%)	hf / Di (%)	Df / Di (%)	hf / hi (%)
A	19,00	8,70	92%	1578,14	17,80	8,40	94%	1355,49	86%	44%	94%	97%
B	21,00	9,30	89%	2031,74	19,87	9,00	91%	1777,10	87%	43%	95%	97%
C	13,30	6,20	93%	555,47	12,35	5,97	97%	468,99	84%	45%	93%	96%
D	19,60	9,10	93%	1767,39	17,76	8,95	101%	1482,48	84%	46%	91%	98%
E	17,80	8,30	93%	1332,10	17,22	8,10	94%	1221,48	92%	46%	97%	98%
F	17,40	8,60	99%	1355,52	17,35	8,04	93%	1222,54	90%	46%	100%	93%
G	21,90	9,40	86%	2205,31	20,50	8,23	80%	1650,21	75%	38%	94%	88%
H	18,40	7,90	86%	1308,48	17,10	7,40	87%	1061,91	81%	40%	93%	94%
I	21,50	9,10	85%	2046,45	19,82	9,02	91%	1776,20	87%	42%	92%	99%
J	20,60	9,00	87%	1881,52	20,12	8,48	84%	1666,91	89%	41%	98%	94%
K	21,80	7,20	66%	1539,14	21,10	7,00	66%	1403,43	91%	32%	97%	97%
L	17,00	6,70	79%	917,86	16,02	6,50	81%	798,29	87%	38%	94%	97%
M	21,00	9,20	88%	2000,98	19,80	9,00	91%	1767,29	88%	43%	94%	98%
N	20,70	9,00	87%	1896,11	17,55	8,64	98%	1382,89	73%	42%	85%	96%
O	21,80	10,40	95%	2529,89	20,10	10,12	101%	2148,63	85%	46%	92%	97%
P	18,20	8,50	93%	1427,22	17,41	8,30	95%	1287,58	90%	46%	96%	98%
Q	18,40	9,10	99%	1604,43	16,08	8,30	103%	1142,24	71%	45%	87%	91%
R	21,90	9,50	87%	2238,17	20,60	8,25	80%	1668,84	75%	38%	94%	87%
S	17,20	6,70	78%	935,86	16,02	6,50	81%	798,29	85%	38%	93%	97%
T	21,80	10,30	94%	2494,40	20,10	9,97	99%	2101,06	84%	46%	92%	97%

Di- diâmetro congelado; hi profundidade congelada; hi/ri (%) profundidade congelada em relação ao raio congelado; Vi volume de congelamento; Df diâmetro da necrose; hf- profundidade da necrose; hf/rf (%) profundidade da necrose em relação ao raio da necrose; Vf- volume da necrose; Vf/Vi- Volume da Necrose em relação ao Volume Congelado; hf / Di (%) - Profundidade da Necrose em relação ao Diâmetro Congelado; Df / Di (%) - Diâmetro da Necrose em relação ao Diâmetro Congelado; hf / hi (%) - Profundidade da Necrose em relação à Profundidade Congelada; Tomo – Tomografia; Histo - Histopatologia

Tabela 2 - Mensuração e relação das medidas obtidas por tomografia durante o congelamento imediato e da necrose provocada 96 horas após, por histopatologia em pele de cães da raça Beagle, submetidos a aplicação do nitrogênio líquido pela sonda metálica congelada (tempo total de 75 segundos). São Paulo, 2004.

cão	Sonda TOMO			Histo				Comparação				
	Di	hi	hi / ri (%)	Vi	Df	hf	hf / rf (%)	Vf	Vf / Vi (%)	hf / Di (%)	Df / Di (%)	hf / hi (%)
A	17,80	6,23	70%	901,76	14,45	6,21	86%	635,09	70%	35%	81%	100%
B	19,40	7,75	80%	1389,15	16,35	7,13	87%	938,38	68%	37%	84%	92%
C	18,70	5,10	55%	769,80	16,20	4,87	60%	562,38	73%	26%	87%	95%
D	18,60	7,40	80%	1217,53	17,96	7,01	78%	1068,71	88%	38%	97%	95%
E	18,30	8,00	87%	1320,17	17,51	7,74	88%	1174,16	89%	42%	96%	97%
F	19,10	8,27	87%	1480,92	18,05	8,14	90%	1323,54	89%	43%	94%	98%
G	20,20	7,30	72%	1373,42	19,86	7,19	72%	1308,13	95%	36%	98%	98%
H	19,10	5,90	62%	952,77	17,02	4,97	58%	630,35	66%	26%	89%	84%
I	19,90	7,70	77%	1436,49	17,76	7,61	86%	1172,22	82%	38%	89%	99%
J	21,00	5,40	51%	1017,62	18,03	4,97	55%	698,74	69%	24%	86%	92%
K	22,60	9,20	81%	2253,01	18,71	7,52	80%	1256,80	56%	33%	83%	82%
L	20,40	6,80	67%	1275,93	20,16	6,60	65%	1203,92	94%	32%	99%	97%
M	21,10	7,60	72%	1558,58	17,72	7,10	80%	1062,88	68%	34%	84%	93%
N	19,30	7,60	79%	1341,55	14,44	7,10	98%	768,43	57%	37%	75%	93%
O	21,40	8,80	82%	1939,41	19,97	8,10	81%	1547,04	80%	38%	93%	92%
P	19,70	6,90	70%	1223,58	18,90	6,70	71%	1097,33	90%	34%	96%	97%
Q	20,00	6,00	60%	1055,58	15,02	5,90	79%	630,32	60%	30%	75%	98%
R	20,40	7,20	71%	1372,10	19,78	7,02	71%	1259,71	92%	34%	97%	98%
S	22,10	9,10	82%	2139,93	18,79	7,55	80%	1272,13	59%	34%	85%	83%
T	20,40	7,10	70%	1347,72	20,16	6,80	67%	1250,40	93%	33%	99%	96%

Di- diâmetro congelado; hi profundidade congelada;hi/ri (%) profundidade congelada em relação ao raio congelado; Vi volume de congelamento; Df diâmetro da necrose; hf-profundidade da necrose; hf/rf (%) profundidade da necrose em relação ao raio da necrose; Vf-volume da necrose; Vf/Vi- Volume da Necrose em relação ao Volume Congelado; hf / Di (%) -Profundidade da Necrose em relação ao Diâmetro Congelado; Df / Di (%) -Diâmetro da Necrose em relação ao Diâmetro Congelado; hf / hi (%) - Profundidade da Necrose em relação à Profundidade Congelada; Tomo Tomografia; Histo - Histopatologia

Tabela 3 - Mensuração e relação das medidas obtidas por tomografia durante o congelamento imediato e da necrose provocada 96 horas após, por histopatologia em pele de cães da raça Beagle, submetidos à aplicação do nitrogênio líquido pelo spray (tempo total de 75 segundos). São Paulo, 2004.

cão	Spray I Tomo			Histo				Comparação				
	Di	hi	hi / ri (%)	Vi	Df	hf	hf / rf (%)	Vf	Vf / Vi (%)	hf / Di (%)	Df / Di (%)	hf / hi (%)
A	15,80	7,50	95%	956,14	14,47	7,36	102%	814,02	85%	47%	92%	98%
B	16,00	7,50	94%	974,88	15,16	7,17	95%	839,83	86%	45%	95%	96%
C	19,70	7,10	72%	1269,46	18,72	6,74	72%	1087,85	86%	34%	95%	95%
D	22,00	10,40	95%	2565,67	21,15	10,00	95%	2279,62	89%	45%	96%	96%
E	21,00	10,00	95%	2255,40	16,69	8,56	103%	1264,33	56%	41%	79%	86%
F	23,30	9,10	78%	2334,62	15,23	7,73	101%	945,40	40%	33%	65%	85%
G	24,80	8,80	71%	2482,24	22,80	8,60	75%	2088,65	84%	35%	92%	98%
H	25,60	12,10	95%	4041,63	20,01	10,41	104%	2227,01	55%	41%	78%	86%
I	21,60	10,10	94%	2389,96	19,19	9,96	104%	1956,77	82%	46%	89%	99%
J	19,20	7,60	79%	1330,06	18,20	7,16	79%	1124,15	85%	37%	95%	94%
K	19,70	9,80	99%	1986,35	18,41	9,33	101%	1666,65	84%	47%	93%	95%
L	20,70	7,30	71%	1432,04	19,23	7,10	74%	1218,97	85%	34%	93%	97%
M	17,90	5,30	59%	744,82	16,92	5,10	60%	642,82	86%	28%	95%	96%
N	18,70	7,90	84%	1343,01	15,82	7,52	95%	962,30	72%	40%	85%	95%
O	19,10	8,70	91%	1591,16	16,59	8,44	102%	1226,65	77%	44%	87%	97%
P	17,90	8,10	91%	1297,44	15,70	7,90	101%	1023,02	79%	44%	88%	98%
Q	19,60	7,40	76%	1328,53	16,08	7,32	91%	948,70	71%	37%	82%	99%
R	21,50	9,90	92%	2305,15	19,00	9,26	97%	1728,49	75%	43%	88%	94%
S	20,80	7,40	71%	1469,42	19,32	7,21	75%	1253,09	85%	35%	93%	97%
T	16,20	7,80	96%	1052,34	15,27	7,42	97%	893,33	85%	46%	94%	95%

Di- diâmetro congelado; hi profundidade congelada;hi/ri (%) profundidade congelada em relação ao raio congelado; Vi volume de congelamento; Df diâmetro da necrose; hf-profundidade da necrose; hf/rf (%) profundidade da necrose em relação ao raio da necrose; Vf-volume da necrose; Vf/Vi- Volume da Necrose em relação ao Volume Congelado; hf / Di (%) -Profundidade da Necrose em relação ao Diâmetro Congelado; Df / Di (%) -Diâmetro da Necrose em relação ao Diâmetro Congelado; hf / hi (%) - Profundidade da Necrose em relação à Profundidade Congelada; Tomo Tomografia; Histo - Histopatologia

Tabela 4 - Mensuração e relação das medidas obtidas por tomografia durante o congelamento imediato e da necrose provocada 96 horas após, por histopatologia em pele de cães da raça Beagle, submetidos à aplicação do nitrogênio líquido pelo spray (tempo total de 135 segundos). São Paulo, 2004.

cão	Spray II			Vi	Histo			Vf	Vf / Vi (%)	Comparação		
	Di	hi	hi / ri (%)		Df	hf	hf / rf (%)			hf / Di (%)	Df / Di (%)	hf / hi (%)
A	18,50	7,80	84%	1296,80	17,30	7,67	89%	1137,60	88%	41%	94%	98%
B	17,40	8,50	98%	1332,15	16,61	8,20	99%	1177,10	88%	47%	95%	96%
C	18,80	6,90	73%	1129,70	17,86	6,10	68%	882,95	78%	32%	95%	88%
D	20,60	9,60	93%	2063,05	19,92	9,16	92%	1828,64	89%	44%	97%	95%
E	16,80	6,10	73%	794,94	16,45	6,00	73%	750,69	94%	36%	98%	98%
F	20,60	9,50	92%	2032,06	17,71	9,05	102%	1502,81	74%	44%	86%	95%
G	20,78	9,10	88%	1938,29	19,70	8,99	91%	1751,53	90%	43%	95%	99%
H	22,20	7,60	68%	1700,73	16,67	5,70	68%	718,93	42%	26%	75%	75%
I	19,80	7,30	74%	1327,55	17,37	7,01	81%	1010,62	76%	35%	88%	96%
J	23,10	8,60	74%	2135,15	22,72	8,04	71%	1900,85	89%	35%	98%	93%
K	24,90	10,70	86%	3246,64	23,45	9,53	81%	2510,54	77%	38%	94%	89%
L	20,90	6,10	58%	1165,21	19,34	6,00	62%	994,40	85%	29%	93%	98%
M	23,00	7,50	65%	1778,93	14,66	4,95	68%	481,55	27%	22%	64%	66%
N	17,80	6,20	70%	896,21	15,87	5,79	73%	674,44	75%	33%	89%	93%
O	19,50	9,70	99%	1926,32	18,56	9,52	103%	1739,26	90%	49%	95%	98%
P	21,20	9,80	92%	2222,45	20,15	9,50	94%	1963,89	88%	45%	95%	97%
Q	20,00	8,90	89%	1767,13	17,33	8,51	98%	1326,53	75%	43%	87%	96%
R	20,30	9,30	92%	1926,15	19,82	8,97	91%	1761,66	91%	44%	98%	96%
S	20,75	9,30	90%	1993,62	19,70	9,10	92%	1781,43	89%	44%	95%	98%
T	24,30	11,20	92%	3332,73	23,00	9,12	79%	2291,74	69%	38%	95%	81%

Di- diâmetro congelado; hi profundidade congelada; hi/ri (%) profundidade congelada em relação ao raio congelado; Vi volume de congelamento; Df diâmetro da necrose; hf-profundidade da necrose; hf/rf (%) profundidade da necrose em relação ao raio da necrose; Vf-volume da necrose; Vf/Vi- Volume da Necrose em relação ao Volume Congelado; hf / Di (%) -Profundidade da Necrose em relação ao Diâmetro Congelado; Df / Di (%) -Diâmetro da Necrose em relação ao Diâmetro Congelado; hf / hi (%) - Profundidade da Necrose em relação à Profundidade Congelada; Tomo Tomografia; Histo - Histopatologia

Os exames histopatológicos, para determinação de necrose tecidual, eram colhidos 96 horas após o congelamento. Após o processamento das amostras colhidas as lâminas foram montadas e, por recomendações técnicas e metodológicas, foram avaliadas microscopicamente, pelo mesmo pesquisador em grupos de 20 ou 40 lâminas. Nesta fase do estudo pôde-se evidenciar a crionecrose induzida pelo procedimento, bem como mensurar suas medidas de diâmetro e de profundidade (raio). Obteve-se ainda a relação entre tais medidas (Tabelas 1 a 4). Os resultados das comparações entre as diferentes técnicas de aplicação do nitrogênio líquido, são apresentados a seguir

5.1 Volume da necrose em relação ao volume do congelamento (V_f/V_i)

Tabela 5 - Estatística descritiva dos valores obtidos quanto ao volume de necrose em relação ao volume de congelamento (V_f/V_i %), segundo diferentes técnicas de aplicação do nitrogênio líquido, São Paulo, 2004.

Valores	Derrame	Sonda	Spray I	Spray II
Média	84,20%	76,90%	78,90%	78,70%
Mediana	85,60%	76,40%	86,50%	84,70%
Desvio-padrão	6,20%	13,70%	17,00%	13,10%
Erro-padrão	1,00%	3,00%	4,00%	3,00%
Mínimo	71,20%	55,80%	27,10%	40,50%
Máximo	91,70%	95,30%	94,40%	88,90%

$p=0,295$

Mesmo havendo indicações de diferenças entre os volumes de congelamento e de necrose alcançados pelas diferentes técnicas, a relação entre o volume de tecido congelado e necrose obtida por este congelamento (volume de tecido necrosado), se mantém semelhante ($p>0,05$) (Tabela 5). Há uma variação, onde o volume de necrose corresponde a 76,9% (sonda) à 84,2% (derramamento) do volume de tecido congelado. Estas relações estão representadas no gráfico 1.

Gráfico 1 - Comparação do volume médio do congelamento (V_i) com o volume médio da necrose obtida (V_f), segundo diferentes técnicas de crioterapia, mensurados respectivamente pela tomografia computadorizada e pela histopatologia, em pele íntegra de cães da raça Beagle. São Paulo, 2004.

5.2 Profundidade e diâmetro da necrose em relação àquelas do congelamento (hf/hi e Df/Di)

As relações entre os diâmetros de congelamento e necrose, bem como a profundidade de congelamento em relação àquela de necrose, não apresentam diferenças estatisticamente significativas, indicando que em todas as técnicas o diâmetro e profundidade da necrose provocada pela crioterapia, são menores que o diâmetro e a profundidade do congelamento, respectivamente. Havendo, ainda, uma diminuição destes valores de maneira estatisticamente semelhante (Tabelas 6 e 7). O diâmetro de necrose correspondeu a 89,4% (sonda) à 93,5% (derramamento). A profundidade de necrose apresentou uma diminuição de 4,15 (spray II) à 6% (sonda) em relação às medidas de congelamento.

Tabela 6 - Estatística descritiva dos valores obtidos quanto ao diâmetro de necrose em relação ao diâmetro de congelamento (Df/Di %), segundo diferentes técnicas de aplicação do nitrogênio líquido, São Paulo, 2004.

	Derrame	Sonda	Spray I	Spray II
Média	93,50%	89,40%	91,20%	88,70%
Mediana	93,70%	89,20%	94,70%	91,80%
Desvio-padrão	3,30%	7,70%	8,50%	7,70%
Erro-padrão	1,00%	2,00%	2,00%	2,00%
Mínimo	84,80%	74,80%	63,70%	65,40%
Máximo	99,70%	98,80%	98,40%	96,10%

p-valor = 0,104

Tabela 7 - Estatística descritiva dos valores obtidos da profundidade de necrose em relação a profundidade do congelamento (hf/hi %), segundo diferentes técnicas de aplicação do nitrogênio líquido, São Paulo, 2004.

	Derrame	Sonda	Spray I	Spray II
Média	95,40%	94,00%	92,40%	95,90%
Mediana	96,80%	95,60%	95,80%	96,60%
Desvio-padrão	3,40%	5,30%	8,80%	6,10%
Erro-padrão	1,00%	1,00%	2,00%	1,00%
Mínimo	86,80%	81,70%	66,00%	85,00%
Máximo	99,10%	99,80%	98,80%	114,60%

p-valor = 0,254

5.3 Profundidade de congelamento em relação ao seu raio (hi/ri)

Tabela 8 - Estatística descritiva dos valores obtidos da profundidade de congelamento em relação ao seu raio (hi/ri %), segundo diferentes técnicas de aplicação do nitrogênio líquido, São Paulo, 2004.

	Derrame	Sonda	Spray I	Spray II
Média	88,40%	72,70%	82,60%	84,90%
Mediana	88,10%	72,20%	86,80%	90,80%
Desvio-padrão	7,80%	10,20%	11,90%	11,70%
Erro-padrão	66,10%	51,40%	58,40%	59,20%
Mínimo	66,10%	51,40%	58,40%	59,20%
Máximo	98,90%	87,40%	99,50%	99,50%

p-valor=0,000

Tabela 9 - Comparações múltiplas, após análise de variância com medidas repetidas, para averiguação de diferenças estatisticamente significantes entre as técnicas ($p < 0,005$), São Paulo, 2004.

Técnica I	Técnica II	p-valor
derrame	sonda	0,000*
	spray I	0,264
	spray II	1,000
sonda	spray I	0,016*
	spray II	0,003*
spray I	spray II	1,000

*** significância estatística**

A relação entre o raio do congelamento e a sua profundidade, foi menor na técnica de aplicação do nitrogênio por sonda metálica, em relação às demais técnicas utilizadas, onde a profundidade do congelamento correspondeu, em média, a 72,7% do raio do halo de congelamento visualizado. Nas outras técnicas (derramamento, spray I e II) apesar dos valores indicarem nítidas diferenças, a profundidade de congelamento variou de 82,6 a 88,4% do raio, não havendo diferenças estatisticamente significativas (Tabelas 8 e 9) entre estas desigualdades, havendo, contudo, semelhanças na relação entre raio do congelamento e profundidade, entre as técnicas de congelamento por spray I, spray II e por derramamento, Mesmo com aplicações, com duração de 75 e 135 segundos, as duas técnicas de spray, revelaram relações semelhantes entre raio e profundidade. Estas relações percentuais estão representadas graficamente (Gráfico 2).

Gráfico 2 - Comparação da média dos raios do congelamento (ri) com a média das profundidades obtidas (hi), segundo diferentes técnicas de crioterapia, mensurados pela tomografia computadorizada em pele íntegra de cães da raça Beagle. São Paulo, 2004

5.4 Profundidade da necrose em relação ao seu raio (hf/rf)

A relação entre o raio da crionecrose e a profundidade do tecido necrosado, se mostrou menor quando o nitrogênio foi aplicado por sonda metálica (76,8%) em relação às técnicas de derramamento (90,4%) e spray II (92,2%) ($p < 0,05$), mas esta relação, não difere estatisticamente da técnica de spray I (83,8%). A relação entre o raio da necrose e a profundidade, não difere estatisticamente (Tabelas 10 e 11) quando o tempo de congelamento é dobrado, comparando-se a técnicas de spray I e II ($p > 0,05$). Estas relações estão representadas no gráfico 3.

Tabela 10 - Estatística descritiva dos valores obtidos da profundidade de necrose em relação ao raio de necrose (hf/rf %), segundo diferentes técnicas de aplicação do nitrogênio líquido, São Paulo, 2004.

	Derrame	Sonda	Spray I	Spray II
Média	90,40%	76,80%	83,80%	92,20%
Mediana	91,80%	79,40%	85,00%	98,90%
Desvio-padrão	9,30%	11,50%	12,90%	14,00%
Erro-padrão	2,00%	3,00%	3,00%	3,00%
Mínimo	66,40%	55,10%	62,10%	60,30%
Máximo	103,20%	98,40%	102,60%	105,50%

p-valor=0,000

Tabela 11 - Comparações múltiplas, após análise de variância com medidas repetidas, para averiguação de diferenças estatisticamente significantes entre as técnicas ($p < 0,005$), São Paulo, 2004.

Técnica I	Técnica II	p-valor
derrame	sonda	0,001*
	spray I	0,300
	spray II	1,000
sonda	spray I	0,185
	spray II	0,001*
spray I	spray II	0,092

*significância estatística

Gráfico 3 - Comparação das médias dos raio da crionecrose (rf) com a média das profundidades obtidas (hf), segundo diferentes técnicas de crioterapia, mensurados pela histopatologia em pele íntegra de cães da raça Beagle. São Paulo, 2004.

5.5 Profundidade da necrose em relação ao diâmetro do congelamento (hf/Di)

Quando se analisa a relação existente entre o diâmetro de congelamento e a profundidade de necrose, observa-se que a profundidade de necrose obtida pelo método de crioterapia pela sonda fechada é bem mais superficial (corresponde a 34,2% do diâmetro congelado) que a necrose advinda do congelamento por derramamento direto (42,2%), bem como pela técnica de aplicação de spray II (40,6%), como se pode evidenciar pela análise das tabelas 12 e 13.

Quando comparadas as técnicas de congelamento por derramamento e por spray I e II, por, respectivamente, 75 segundos e 135 segundos, observa-se que a relação obtida entre o diâmetro de congelamento e a profundidade da necrose não apresentam diferenças estatisticamente significativas, independentemente da técnica escolhida, obtendo-se o valor de 38,4 a 40,6% do diâmetro de congelamento (Tabelas 12 e 13).

Tabela 12 - Estatística descritiva dos valores obtidos da profundidade de necrose em relação ao diâmetro de congelamento (hf/Di %), segundo diferentes técnicas de aplicação do nitrogênio líquido, São Paulo, 2004.

	Derrame	Sonda	Spray I	Spray II
Média	42,20%	34,20%	38,40%	40,60%
Mediana	42,90%	34,30%	39,90%	42,00%
Desvio-padrão	3,90%	5,00%	7,40%	5,70%
Erro-padrão	1,00%	1,00%	2,00%	1,00%
Mínimo	32,10%	23,70%	21,50%	28,50%
Máximo	46,40%	42,60%	48,80%	48,40%

p-valor=0,000

Tabela 13 - Comparações múltiplas, após análise de variância com medidas repetidas, para averiguação de diferenças estatisticamente significantes entre as técnicas ($p < 0,005$), São Paulo, 2004

Técnica I	Técnica II	p-valor
derrame	sonda	0,000*
	spray I	0,243
	spray II	1,000
sonda	spray I	0,091
	spray II	0,003*
spray I	spray II	0,948

***significância estatística**

Em nenhuma das correlações houve diferenças estatisticamente relevantes, quando foram comparadas as técnicas de spray I (75 segundos de congelamento) e spray II (135 segundos de congelamento).

Considerando-se que o diâmetro do congelamento (D_i), é obtido imediatamente pelo profissional que está realizando o procedimento, e suas relações com aprofundidade de necrose (hf/D_i), pode-se propor:

Relação hf/D_i (%) = α

	$hf/D_i = \alpha$	τ padrão
Derrame	42,2%	3,9%
Sonda	34,2%	5,0%
Spray I	38,4%	7,4%
Spray II	40,6%	5,7%

$$hf / D_i = \alpha \pm \tau$$

onde τ é o desvio padrão

$$D_i = hf / (\alpha \pm \tau)$$

para uma dada profundidade desejada de necrose (hf), o diâmetro de congelamento necessário será, calculando-se o pior caso, igual a:

$$D_i = hf / (\alpha - \tau)$$

Baseado nos cálculos ora obtidos, fórmulas de tratamento puderam ser propostas e criadas a partir das médias, incluindo o desvio padrão, considerando-se a pior das hipóteses, como demonstrado acima, para que a aplicação da crioterapia possa ser previamente estimada (Tabela 14).

Tabela 14 - Fórmulas de obtenção do halo de congelamento necessário, a partir da profundidade de necrose pretendida, segundo a técnica de aplicação de crioterapia. São Paulo, 2004

Técnica	Fórmula para obtenção do halo de congelamento
Derramamento	$D_i = hf / 0,38$
Sonda	$D_i = hf / 0,29$
Spray I	$D_i = hf / 0,35$
Spray II	$D_i = hf / 0,31$

Figura 12 - Tomografia de membro torácico de cão Beagle submetido a crioterapia pelo método do derramamento (75 segundos de congelamento) , evidenciando a calota esférica de gelo, e suas mensurações de diâmetro (AB) e profundidade (CD). São Paulo, 2004.

Figura 13 - Tomografia de membro torácico de cão Beagle submetido a crioterapia pelo método da sonda (75 segundos de congelamento) , evidenciando a calota esférica de gelo, e suas mensurações de diâmetro (AB) e profundidade (CD). São Paulo, 2004.

Figura 14 - Tomografia de membro torácico de cão Beagle submetido a crioterapia pelo método do spray I (75 segundos de congelamento), evidenciando a calota esférica de gelo, e suas mensurações de diâmetro (AB) e profundidade (CD).
São Paulo, 2004.

Figura 15 - Tomografia de membro torácico de cão Beagle submetido a crioterapia pelo método do spray II (135 segundos de congelamento), evidenciando a calota esférica de gelo, e suas mensurações de diâmetro (AB) e profundidade (CD). São Paulo, 2004.

6 Discussão

6.1 Monitorização da formação da calota esférica de gelo

A precisa avaliação de como o congelamento se propaga em um tecido, tem especial importância, no tratamento das neoplasias, pois se houver uma diferença entre o tecido que se pretende tratar e aquele realmente congelado, seguramente haverá recidiva da neoplasia ou ainda falha terapêutica. Segundo Popken et al. (2000), em 10 anos de acompanhamento de casos de metástases hepáticas oriundas de neoplasias coloretais criotratadas, sem monitorização por imagens, houve recidiva em 44% dos pacientes, revelando um inadequado congelamento tecidual. Outra constante preocupação dos autores, como Kalbhen et al. (1998), é o fato de que sem uma perfeita avaliação da progressão do congelamento, estruturas anatomicamente próximas ao local tratado podem ser destruídas sem necessidade, provocando uma série de seqüelas, que proporcionam uma avaliação negativa do procedimento. Observações similares foram assinaladas por Escudero et al. (2003). O congelamento de pele (íntegra) de cães pôde realmente ser avaliado através da tomografia computadorizada. Esta técnica revelou-se útil para medições de diferentes parâmetros, possibilitando a visualização final em cortes seriados de imagens e o congelamento em vários pontos, no mesmo procedimento, tais vantagens e suas indicações confirmam as observações de vários autores (LEE JR. et al., 1999; SILVERMAN et al., 2000; YANG et al., 2000; KUSZYK et al., 2000; GRANOV et al., 2001; WEI et al., 2002; SALIKEN et al., 2002; BUTTS et al., 2003, 2003; FOURNIAL, 2004). Apenas Rubinsky et al. (1995) executou trabalho semelhante em pele de coelhos vivos, no entanto sem comparar técnicas ou relacionamento de medidas de congelamento e destruição tecidual. Finalmente, Laugier e Berger (1993) realizaram acompanhamento do congelamento por ecografia em amostras de pele, *in vitro*, apenas para comprovar a viabilidade da monitorização da crioterapia por esta técnica.

A desvantagem da tomografia como método de avaliação é a anestesia geral a qual o animal obrigatoriamente deve ser submetido, porém a mesma observação vale para estimativas

realizadas por outros autores com a ressonância magnética (GILBERT et al., 1997; KUSZYK et al., 2000; RUBINSKY et al., 1995; MALA et al., 2003; BUTTS et al., 2003). Deve-se destacar, ainda, que a maioria dos procedimentos crioterápicos realizados em medicina veterinária, são efetuados sob anestesia geral, de curta duração, sendo que o procedimento perdura por 120 a 240 segundos, na maioria dos procedimentos (LUCAS, 1999). Permitindo, assim, que o exame seja realizado, aproveitando-se da mesma anestesia, de curta duração, uma vez que a formação da imagem se dá quase que instantaneamente.

6.2 Relação entre o volumes de congelamento e de necrose tecidual (V_f/V_i)

Antes de se avaliar as relações entre as medidas de congelamento superficial e profundo, deve-se abordar a proporcionalidade de morte tecidual obtida após o congelamento de um determinado tecido. Segundo Granov et al. (2001), a importância de tais determinações, pode alterar resultados aparentemente exitosos em qualquer modalidade de crioterapia. Aquele autor propôs, em seu trabalho, a mudança de protocolos já consagrados de tratamento de neoplasias de próstata, por julgá-los capazes de permitir que o tecido neoplásico localizado na borda do congelamento persista viável, retratando diminuição da efetividade do método. Não há na, literatura nacional ou internacional, trabalhos que comparem quatro técnicas diferentes de aplicação do nitrogênio em pele de animais vivos, buscando elucidar e comparar medidas de congelamento e morte tecidual, para posterior aplicação clínica.

Há, porém, trabalhos que determinam, a morte celular, estimando que esta ocorra entre 38°C e -40°C negativos (POPKEN et al., 2000, YANG et al., 2000; RUBINSKY et al., 1995; BUTTS et al., 2003; SEIFERT et al., 2003). Todos estes autores, estribados naquela faixa térmica dita letal, através de determinações da temperatura tecidual por termossensores, durante o congelamento, estimaram que a morte celular ocorra na região correspondente a isoterma (faixa de temperatura circular). Apesar de utilizarem-se de metodologias diferentes, os trabalhos bus-

caram evidenciar as relações térmicas e alterações macroscópicas observadas, durante o congelamento, e, ainda, a relação entre temperatura de congelamento e necrose. Rubinsky et al. (1995) comprovaram que se pode mensurar o congelamento em pele de coelhos, indicando em suas conclusões que toda a neoplasia a ser tratada deve estar totalmente dentro da esfera de gelo, mas não determinando o quanto, ressaltaram, porém que a quantidade de tecido destruído é menor que aquela congelada. Popken et al. (2000), em seu experimento, congelaram tanto fígados de porco como de seres humanos (com metástases de neoplasia coloretal), retirados cirurgicamente e mantidos em solução salina à temperatura estável de 37°C. Obtiveram resultados semelhantes entre estes dois tecidos observando, com diferentes sondas de crioablação (3 e 8mm AccuProbe 450 System, CMS, USA), que os halos de congelamento, avaliados visualmente, variaram de 40 a 56 mm, obtendo lesão tecidual (estimaram que a morte tecidual ocorrera na faixa dos 40°C negativos, pois o experimento foi realizado *ex vivo*) em halos respectivamente de 30 e 44 mm. Ao serem calculados os volumes relacionados a estas medidas, Obter-se-ia que os volumes de suposta morte celular seriam de 42 e 65% do volume congelado. Tal dado difere das observações obtidas no presente trabalho onde a proporção entre necrose e congelamento foi de 77 a 84%, havendo, portanto, uma significativa maior destruição no tecido cutâneo. Seifert et al. (2003), por sua vez, realizaram estudo semelhante, desta vez *in vivo*, congelando fígado de porcos, avaliando o congelamento visualmente após laparotomia e exteriorização do órgão. Aqueles autores estimaram as diferentes faixas de temperatura obtidas durante o congelamento, em diferentes tempos, utilizando-se de sonda (8mm AccuProbe 450 System, CMS, USA) e correlacionaram estas medidas com a necrose advinda. Após a compilação destes dados os autores propuseram protocolos de tratamento, desta feita correlacionando a morte tecidual com temperatura de 38°C negativos indicando que: para o tratamento de lesões de 37 a 46mm de diâmetro, o congelamento deve ser de respectivamente, 59 e 75mm de diâmetro. Ao se utilizar estes valores, poder-se-ia inferir que o volume de necrose oscilará entre 23 e 25% do volume congelado. Novamente, esta inferência difere muito daquela obtida neste experimento e, também das observações, já referidas, por Popken et al. (2000), que se utilizaram de equipamento e

protocolos semelhantes ao de Seifert et al. (2003).

Uma diferença de metodologia deste último experimento é o fato de que a colheita dos órgãos para análise histopatológica se deu 24 horas após o congelamento, contrariando as informações de Mala et al. (2003) e, também, de Lee Jr. et al (1999), que assinalaram que o período ideal para colheita do material a ser submetido à análise histológica seria de 96 horas, pois neste interregno todas as alterações decorrentes da crioterapia já estariam instaladas e inclusive, já houvera desaparecimento do edema e, subsequente, instalação da retração tecidual. O mesmo critério de tempo para colheita foi utilizado no presente estudo, havendo a remoção do tecido criolesado, após 96 horas da aplicação. As diferenças, ora observadas, podem, eventualmente, se justificar, pelas distintas técnicas e aplicação, mas principalmente, por se tratar de situações muito distantes. Em um dos experimentos, retro referidos, o frio foi aplicado em tecidos *ex vivo*, e no congênere, o órgão submetido ao congelamento era extremamente mais vascularizado que o tecido cutâneo, explicando, em parte, a menor morte tecidual estimada.

O estudo de Mala et al. (2003), revelou que a proporção entre tecidos congelado e necrosado não teve diferença estatisticamente significativa. Curiosamente este é o único dos autores consultado em que não constatou diferenças entre o congelamento e a necrose. Finalmente, as observações obtidas no congelamento de pele íntegra de cães corroboraram a afirmação de Withrow (1989), que afirmara que a necrose corresponde a 70-80% do tecido congelado, dado este observado independentemente da técnica utilizada.

6.3 Relação entre os diâmetros de congelamento e da necrose tecidual

(Df/Di)

Quando abordadas as indicações em dermatologia da crioterapia, geralmente o método de avaliação do congelamento é dado de forma bidimensional porém, para determinar a margem de segurança (aquela que deve ser ultrapassada durante o congelamento para que todo tecido

que se deseja destruir seja realmente lesado) é necessário que o profissional conheça a proporção de necrose que se conseguirá obter em relação ao diâmetro de congelamento. No presente trabalho detectou-se que a proporção entre o diâmetro de necrose correspondeu a 88,7-93,5% do diâmetro congelado, estas observações podem ser comparadas com aquelas de Lee Jr. et al (1999). Em seu trabalho observaram que, em média, o diâmetro da necrose, macroscopicamente avaliado, correspondeu a 93% do diâmetro da crioablação, avaliado pela ressonância magnética, em fígados de suínos, em tempo de congelamento de $11,8 \pm 6,25$ minutos. Nos trabalhos de Gilbert et al. (1997) e Yang et al. (2000), concluiu-se que há uma diminuição de 4 a 6 mm entre o diâmetro do congelamento e o da necrose, sem entretanto revelar qual é o diâmetro total da crioablação, impossibilitando o cálculo percentual desta diminuição. Em congelamentos cutâneos, obtidos por diferentes técnicas, mensuradas neste trabalho, comprovou-se que esta diminuição oscilou entre 1,3 e 7 mm, corroborando os valores supracitados. Porém, Granov et al. (2001) congelaram, *in vitro*, culturas celulares de carcinoma epidermóide e correlacionaram a propagação do frio com diferentes temperaturas. Comprovaram que 100% das células são destruídas a 40°C negativos. Ainda naquele experimento, obtiveram congelamentos em placas de cultivo celular, com diâmetro oscilando de 42 a 65mm com destruição das células em diâmetros que variara, de 32 e 47 mm, havendo portanto uma diminuição situada entre 10 e 18 mm. Tais resultados diferiram daqueles relatados por outros autores e dos obtidos no presente trabalho, possivelmente, pelo fato de que o congelamento tenha sido efetuado em culturas celulares em meios de cultivo, e notoriamente, em condições distintas de um congelamento *in vivo*. Acrescente-se a esta observação que as alterações vasculares, provocadas pelo congelamento, são um importante elemento na instalação da morte tecidual, e não estão, obviamente, presentes em condições experimentais *in vitro*. Entretanto fica claro que o tecido congelado não pode ser considerado o tecido que será destruído, fato este já discutido e que gera distintos protocolos de tratamento, indicando margens, ditas de segurança, variando de três a cinco milímetros, em lesões benignas ou superficiais, e de 5 a 10 mm, em lesões malignas ou profundas (WITHROW et al, 1975; MAIA; RIBEIRO, 1997; PIMENTEL, 1997; THAI; SINCLAIR, 1999; DAWBER,

2001; DAWBER, 2002; KUFLIK, 2004). Se estes parâmetros forem adotados, baseando-se no presente trabalho, a necrose terá alcançado o tecido a ser destruído, promovendo o sucesso terapêutico. Mas, infelizmente, com este acompanhamento visual, ou bidimensional, não se pode avaliar a profundidade de congelamento obtida, mormente quando estamos frente ao tecido cutâneo que permite a aplicação da crioterapia com equipamentos simples, sem nenhum instrumento de monitorização. O fato de se poder realizar um procedimento crioterápico sem acompanhamento de custosos equipamentos proporcionou o grande desenvolvimento desta modalidade terapêutica na dermatologia, destarte este mesmo fator possibilitou que muitos parâmetros fossem apenas sugeridos sem a ansiada precisão determinação científica. A relação entre halo ou diâmetro de congelamento e a profundidade realmente congelada, é que suscita maiores discordâncias entre os trabalhos dos autores compilados.

6.4 Relação entre o raio e a profundidade de congelamento (hi/ri)

Esta relação sofreu alterações com as diferentes técnicas de aplicação do nitrogênio, em pele de cães, sendo a aplicação por sonda metálica fechada, aquela que se mostrou a mais superficial ($p < 0,05$). A relação observada foi, em média, de 72,7% do raio, com valor mínimo de 51,4%. Sendo assim em um congelamento de 20mm a profundidade oscilou entre 5,1 e 7,2 mm. Estas observações contrariam as afirmações de Maia e Ribeiro (1997), que relataram, sem comprovação experimental, que a profundidade do congelamento obtida pela sonda, seria plenamente igual ao raio do halo congelado. Já, Marques (1989) propôs uma fórmula, onde a profundidade do congelamento seria igual a 1,3, multiplicado pela medida que ultrapassaria a borda da sonda utilizada para o congelamento. Seguindo estas discordantes opiniões, a profundidade no mesmo caso de um congelamento com halo de 20mm, seria de 10mm, pela estimativa de Maia e Ribeiro (1997). Conseqüentemente, se houvesse uma neoplasia com 6 mm de profundidade bastaria um congelamento de 12mm de diâmetro. No presente trabalho comprova-se que

um halo de congelamento de 12 mm de diâmetro alcançará, no máximo, quatro milímetros de profundidade, havendo, portanto, cerca dois milímetros de neoplasia sem congelamento. A mensuração proposta por Maia e Ribeiro (1997) superestima a profundidade alcançada por esta técnica, que revelou ser a mais superficial entre aquelas testadas. Ao se considerar as assertivas do segundo autor (MARQUES, 1989), há a clara necessidade de se conhecer o diâmetro da sonda, para que se possa aplicar a fórmula por ele citada. Utilizando-se de sonda semelhante à utilizada no presente experimento (17mm de diâmetro), para se atingir uma profundidade de 6mm, mantendo-se o exemplo, a margem além da sonda deveria ser de 4,6mm ($1,3 \times 4,6 = 5,98$), havendo um congelamento final de 26,2 mm de diâmetro. No entanto com um congelamento de 26,2mm comprovou-se, neste trabalho, que a profundidade, em média, será de 9,5mm. Portanto, este cálculo subestima a profundidade da técnica, sendo deletério em áreas próximas a estruturas anatómicas sensíveis, por provocar um congelamento superficial maior do que o necessário. Ainda, pelo método de Marques (1989), variando-se a dimensão da sonda, os valores podem ser estimados de forma totalmente diferente. Se a sonda apresentasse 20mm de diâmetro, com mais 3,1mm de margem (totalizando 26,2mm de diâmetro de congelamento, como no exemplo anterior), haveria uma profundidade erroneamente estimada de 4mm, havendo, novamente, tecido neoplásico remanescente a congelar, segundo a assertiva, pois se partiu de uma neoplasia de 6mm de profundidade. Contudo, verdadeiramente, a profundidade atingida seria, como a já citada de 9,5mm, tal como o confirmado tomograficamente neste trabalho. Observa-se, portanto, que somente o estabelecimento da margem é contraditório e bem ineficiente na estimativa da profundidade de congelamento.

Quando se aborda a técnica do spray, em distintos tempos de congelamento, bem como a técnica de derramamento, observa-se que não há diferenças estatísticas ($p > 0,05$) entre estes métodos de crioablação. Porém todos eles proporcionam um congelamento mais profundo, quando comparados à aplicação por sonda fechada. Entre estas técnicas, a mais comentada e relacionada a padrões de congelamento seguramente é a técnica de aplicação por spray. Segundo Maia e Ribeiro (1997), profundidade seria igual à metade do raio (50%) do halo do congela-

mento. Outros autores, como Krahwinkel (1980) e Zacarian (1985), relataram que a profundidade do congelamento seria a medida do raio (100%) do halo obtido, formando uma hemisfera, sendo que muitos outros autores concordam com tal afirmação (THAI e SINCLAIR, 1999; DAWBER, 2002; KUFLIK, 2004). Porém no presente estudo comprovou-se que a relação entre o raio do halo de congelamento e a profundidade atingida por estas três técnicas varia de 82,6 a 88,4 % (Gráfico 2), sendo bem mais profundo do que aquela que Maia e Ribeiro (1997) relataram, porém bem mais superficial do que a maioria dos autores utiliza como padrão, provando ser na verdade uma calota de gelo e não uma hemi-esfera. Assim sendo, seguindo-se o exemplo anterior, para que se obtenha o congelamento em lesões de 6mm de profundidade, um congelamento de 12mm seria insuficiente. Destaque-se que, em grandes neoplasias, mormente quando se trata de espécies de grande talhe, estas diferenças aparentemente pequenas, podem ser aquelas diferenças entre a remoção ou não de um processo neoplásico importante. Inopinadamente, a técnica de aplicação por derramamento direto do nitrogênio líquido, em lesões provocadas de 20mm de diâmetro, não se mostrou estatisticamente diferente das técnicas do spray. Sabe-se, também, que se constitui no método mais perigoso de aplicação do nitrogênio (ZACARIAN, 1985; KORPAN, 2001), não sendo vantajosa a sua aplicação em lesões de pequeno porte, pois simplesmente não promove o aumento da destruição tecidual.

6.5 Relação entre as profundidades do congelamento e da necrose (hf/hi)

Embora o conhecimento da profundidade seja extremamente importante para que se saiba se o tecido a ser destruído foi englobado pela “calota de gelo”, deve-se levar em consideração que o diâmetro da necrose linear é menor do que o halo de congelamento. Espera-se, portanto que o mesmo ocorra em todos os sentidos da propagação do frio, havendo, conseqüentemente, uma necrose de menor profundidade. Contudo pela escassez de trabalhos dispostos na literatura, os dados obtidos neste estudo não podem ser cotejados com nenhum outro trabalho. Os

valores apesar de não se diferenciarem estatisticamente entre as distintas técnicas podem corresponder à medidas entre 92,4 e 95,9% da mensuração da profundidade de congelamento, conferindo, portanto uma grande proximidade, entre a estimativa de congelamento e a real destruição tecidual, em termos de profundidade.

Mas como o já referido, o uso cotidiano da crioterapia, não proporciona facilidades técnicas quando da mensuração das precisas medidas durante o ato do congelamento. Sendo assim, o profissional que aplica o congelamento, pode não contar, em todos os momentos, com técnicas mais avançadas de diagnóstico por imagem, o que seria, também, uma contraposição a uma das vantagens decantadas deste procedimento, qual seja: o seu baixo custo (SAXE; MCDONALD, 1976; BOJRAB, 1978; PODOKONJACK, 1982; WITROW, 1989; MARQUES, 1989; LUCAS, 1999).

Traoré et al. (2003) afirmaram que a aplicação do congelamento para fins terapêuticos, sem uma precisa informação da propagação do frio entre os tecidos, tem propiciado grandes porcentagens de insucessos. Lee Jr. et al (1999) já havia proposto, que para que não houvesse insucessos, e que também não se aumentasse muito os gastos com o procedimento, a combinação de técnicas, onde: a mensuração exata da neoplasia ou de outro tecido lesado que se quisesse tratar poderia ser estimada por ultra-sonografia e, posteriormente, a aplicação do nitrogênio seria, então, acompanhada tomograficamente. Entretanto, nas condições brasileiras, a tomografia computadorizada, ainda está bem distante dos exames rotineiros utilizados no cotidiano das clínicas veterinárias. No presente trabalho, propõe-se, finalmente, que com diferentes relações de medidas, a aplicação e escolha da técnica, possam ser realizadas, conhecendo-se tão somente as precisas medidas do tecido lesado (por ultra-sonografia, por exemplo) e, posteriormente, apenas com estas medidas, se possa determinar a quantidade de congelamento que deverá ser efetuado. Para tal, as relações mais importantes são a correlação entre diâmetro de congelamento e profundidade da necrose e, ainda, se houver acompanhamento pós-crioterápico, a profundidade da necrose relativamente ao seu raio.

6.6 Relação entre o diâmetro de congelamento e a profundidade da necrose (hf/Di)

Clinicamente, a relação entre estes parâmetros é que proporciona, mais diretamente ao profissional a estimativa do congelamento que deverá ser efetuado, com a necrose obtida, em termos de profundidade de destruição, havendo, também, nesta informação a precisa determinação do risco a que estão expostas às estruturas próximas e que não deveriam ser lesadas. Quando se comparam as diferentes técnicas de congelamento cutâneo, constata-se que a profundidade de necrose, obtida pelo método de crioterapia, usando-se a sonda fechada é mais superficial que a necrose advinda do congelamento por derramamento direto, bem como pela técnica de aplicação de spray II (135 segundos). Porém, ao se comparar as técnicas de congelamento por derramamento e por spray I e II, por respectivamente 75 segundos e 135 segundos, observa-se que as indicações de diferenças obtidas não apresentam significado estatístico entre as técnicas escolhidas. A necrose observada, pelo congelamento com sonda, corresponde a 34,2% do diâmetro obtido e visualizado pelo profissional que esta realizando o procedimento, conseqüentemente, ter-se-á condições de conhecer a lesão que ainda estará por se instalar. Se um procedimento de congelamento por sonda metálica fechada provocar um halo de 20mm, a necrose que será provocada terá 6,8mm.

Em se tratando da aplicação por spray ou derramamento, esta proporção variará entre 38,4% (spray I), 40,6% (spray II) à 42,2% (derramamento), conseqüentemente, com um halo de congelamento obtido por spray de 20mm de diâmetro, o tecido será destruído até a profundidade de 7,6 mm a 8,1 mm. No caso do congelamento por derramamento a profundidade de morte tecidual será de até 8,4 mm.

6.7 Relação entre as profundidades da necrose em relação ao seu raio obtidas pelo congelamento (hf/rf)

Para avaliar o sucesso da terapia o profissional pode contar, ainda, com o acompanhamento no pós-crioterápico imediato, analisando e mensurando a circunferência de necrose, eliciada pelo procedimento. Com esta aferição, também visual e bidimensional, poder-se-á avaliar a profundidade da necrose provocada, e constatar que o tecido que se queria eliminar foi totalmente destruído. Entre as modalidades avaliadas, repete-se o ocorrido entre o diâmetro de congelamento e a profundidade de necrose, ou seja, a necrose obtida pelo método de crioterapia pela sonda fechada é bem mais superficial que a necrose advinda do congelamento por derramamento direto, bem como pela técnica de aplicação de spray II (135 segundos). Contudo, ao se comparar as técnicas de congelamento por derramamento e por spray I e II, 75 e 135 segundos, respectivamente, observa-se que as indicações de diferenças obtidas não apresentam significado estatístico.

A necrose observada pelo congelamento com sonda corresponde a 76,8% do raio do esfacelo. Em um primeiro momento, e baseando-se nas informações obtidas neste estudo e naqueles de outros autores (LEE JR. et al., 1999; MALA et al., 2003), o tempo desta avaliação deveria ser de 96 horas. Assim, o clínico poderá estimar se, realmente, obteve êxito em destruir, na profundidade previamente desejada. A aplicação por spray, em diferentes tempos, revelou que a proporção de 83,8 a 92,2% do raio da necrose, correspondeu a profundidade de morte celular. Na técnica de derramamento direto do criógeno a profundidade de necrose correspondeu a 90,4% do raio do halo de destruição tecidual, observado macroscopicamente. Com a visualização do halo do congelamento, macroscopicamente, o procedimento pode ser estimado de várias maneiras, como demonstra o quadro 1. Partindo-se de diferentes técnicas de congelamento, onde o clínico aplica o nitrogênio por 75 segundos, formando, por exemplo, um halo de 20mm de diâmetro, pode-se, num primeiro momento, propor que a profundidade de necrose eliciada, será de 6,8mm pelo congelamento com sonda e de 8,4mm pelo congelamento por derramamento

direto (primeira conduta: **C-1**). Se o clínico, contudo preferir, quando do retorno do paciente, com a medição do halo de necrose, ele poderá estimar a profundidade e o valor será exatamente o mesmo (segunda conduta: **C-2**).

Quadro 1 - Quadro esquemático da estimativa da profundidade de necrose provocado pela sonda e por derramamento direto do nitrogênio. Estimativas a partir dos halos de congelamento (C-1) e de necrose (C-2), em milímetros. Porcentagens médias determinadas no experimento. São Paulo, 2004

Com as estimativas ora obtidas, antes de se iniciar um protocolo de crioterapia, o clínico poderá determinar qual medida seria a mais importante ou que, predominantemente, deveria ser priorizada na destruição tecidual: se a medida superficial da lesão ou a profundidade, pois a escolha do modo de aplicação do frio, deve variar conforme a apresentação morfométrica e topográfica da lesão. Pouco freqüentemente, estas se apresentarão de contornos regulares e circulares como pápulas e nódulos. Em alguns trabalhos, já houve a preocupação com tais observações, como aquele de Lucas (1999) que caracterizou 89% das lesões como formações sólidas, tal como o já referido em trabalhos similares de Roberts et al (1986) e de Norsworthy (1977). Das lesões evidenciadas em felinos, e submetidas à crioterapia as perdas teciduais (erosões, úlceras e crostas) foram as mais freqüentemente identificadas (CLARKE, 1991; LUCAS, 1999).

O tratamento crioterápico deve, sempre, levar em consideração as medidas de destruição que devem ser alcançadas. Tais medidas podem ser maiores em diferentes eixos, sendo assim, a caracterização morfológica das lesões elementares cutâneas deve ser priorizada:

Formações sólidas:

- Pápulas, nódulos e tumores - o congelamento deve incluir o maior eixo da lesão, a preocupação principal deve ser com a profundidade
- vegetações e verrucosidades: o congelamento deve incluir principalmente a região exofítica da lesão. Geralmente tratam-se de lesões de pouca profundidade

Coleções líquidas:

- cistos: o congelamento deve incluir todo o cisto. A preocupação principal deve ser a profundidade

Perdas teciduais:

- exulcerações: o principal eixo considerado é o diâmetro da lesão, geralmente tratam-se de lesões pouco profundas.
- Úlceras - todos os eixos devem ser considerados.
- Fístulas: todos os eixos devem ser considerados.

Alterações de espessuras:

- Hiperqueratose: o principal eixo considerado é o diâmetro da lesão, geralmente trata-se de lesão pouco profunda.

Outro fator a ser considerado deve ser o assentamento lesional, mormente de lesões localizadas em regiões próximas a estruturas que não deveriam ser lesadas. A precisa informação de quanto se tenciona destruir, e do quanto não se deve lesar, levará à opção pela técnica mais

adequada. Baseando-se nos resultados do presente experimento e comparando-se todas as relações de medidas obtidas, puderam ser criados modelos de destruição tecidual, segundo as diferentes técnicas avaliadas. (Figuras de 16-19)

Estas nuances de cor, podem explicar, parcialmente, as grandes diferenças de sucesso terapêutico, especialmente em se tratando de neoplasias, com a utilização do congelamento, relatada por diferentes autores. Lucas (1999) e Lucas e Larsson (2001), observaram êxito de até 100% em adenoma sebáceo, no entanto Roberts et al (1986) não obtiveram o mesmo êxito, referindo-se a casos de recidiva de tal neoplasia. Os índices de eliminação de quadros neoplásicos variaram, ainda, na dependência da neoplasia crioterapêutica, como no caso de carcinomas espinocelulares, em cão, que podem variar entre 75% (PODOKONJACK, 1982b) e 100 % (LUCAS; LARSSON, 2001). Entre os felinos tais índices podem variar de 63% (LUCAS, 1999) a 83% (CLARKE, 1991). Quando se enfocam os tumores das glândulas hepatóides ou os adenomas de glândulas perianais, depara-se com um maior número de autores que recorreram ao tratamento crioterápico, para tais neoplasias, com resultados satisfatórios variando, insolitamente, entre quatro e 100% (FARRIS et al ,1976; KRAHWINKEL, 1976; NORSWORTHY, 1977, LISKA; WITRHOW , 1978; PODOKONJACK, 1982b; LUCAS; LARSSON, 2001). A mesma observação pode ser feita entre casos de mastocitoma e de fistulas perianais, com resultados, também, muito variáveis (KRAHWINKEL, 1976; PODOKONJACK , 1982b; GOLOUBEFF; OLIVEIRA, 1999).

Ainda, ao se embasar em levantamentos históricos, como os de Kuflik (2004), e nos trabalhos de Pimentel (1997) e Dawber (2001 e 2002), poder-se-á constatar grandes diferenças de êxito em diferentes neoplasias. A título de exemplo, cita-se o tratamento do carcinoma basocelular, que pode apresentar índices de cura entre 50 e 100%. Entretanto, Dawber (2001), em sua compilação, citou que os insucessos e as recidivas que geram índices bem discrepantes estão relacionados às lesões maiores que 20mm de diâmetro e/ou naquelas localizadas em regiões próximas à estruturas importantes, onde acabaria ocorrendo um erro, ao se optar por menores dimensões de congelamento às realmente necessárias, acarretando, assim, à falhas na destruição da periferia da neoplasia. Ressal-

te-se que os índices de cura, entre as lesões benignas, são extremamente semelhantes, possivelmente por se tratarem de lesões muito superficiais e de pequenas dimensões.

Inúmeros outros trabalhos propuseram protocolos relacionados às margens de segurança (medida de congelamento além dos limites do tecido acometido) em lesões benignas ou malignas (THAI; SINCLAIR, 1999; KUFLIK et al., 2000; DAWBER, 2001; DAWBER, 2002; KUFLIK, 2004). O presente trabalho comprova que protocolos simples, além da definição padrão de margens de segurança podem gerar erros de aplicação da técnica crioterápica, levando, conseqüentemente, à falhas na terapia.

Utilizando-se das fórmulas de tratamento obtidas neste experimento (Tabela 14), basta, portanto, que o profissional conheça, por qualquer método de diagnóstico, ou, ainda, estime a profundidade do tecido que se pretende destruir. Conseqüentemente, se conhecerá a profundidade de necrose pretendida, e a escolha da técnica mais adequada será determinada.

A título de exemplo, se a profundidade de necrose (hf) que se deseja obter é de 10mm:

Pela técnica de sonda ter-se-ia: $Di = hf / 0,29$, portanto, $Di = 10 / 0,29$ (Tabela 14), conseqüentemente, o halo de congelamento (Di) deveria ser de aproximadamente 34,4mm de diâmetro. Já, pela técnica do spray I, o diâmetro almejado seria: $Di = 10 / 0,35$, ou seja 28,5mm. Deduz-se, portanto que em locais próximos a estruturas delicadas, o congelamento pela técnica do spray é vantajoso em relação à sonda fechada, pois, para se atingir a mesma profundidade, a lesão superficial será maior com a sonda. Da mesma forma, em lesões mais planas e superficiais, onde poucas profundidades de congelamento são necessárias, o congelamento pela sonda seria o mais indicado.

Espera-se que as determinações possam propiciar ao profissional maior compreensão das diferentes possibilidades de aplicação do frio em tecidos, propiciando-se, assim, maiores índices de sucesso, deste já consagrado método de terapia.

Figura 16 - representação esquemática, estimadas a partir das médias, do congelamento total (azul + roxo), da área congelada e que não sofreu necrose (somente azul) e da área de necrose (somente roxo), provocadas pela técnica do derramamento.

Figura 17 - representação esquemática, estimadas a partir das médias, do congelamento total (azul + roxo), da área congelada e que não sofreu necrose (somente azul) e da área de necrose (somente roxo), provocadas pela técnica da sonda fechada.

Figura 18 - representação esquemática, estimadas a partir das médias, do congelamento total (azul + roxo), da área congelada e que não sofreu necrose (somente azul) e da área de necrose (somente roxo), provocadas pela técnica do spray I.

Figura 19 - representação esquemática, estimadas a partir das médias, do congelamento total (azul + roxo), da área congelada e que não sofreu necrose (somente azul) e da área de necrose (somente roxo), provocadas pela técnica do spray II.

7 Conclusões

Em função da metodologia empregada pôde-se concluir que:

1. a tomografia computadorizada mostrou-se como técnica viável e exequível no acompanhamento do congelamento, proporcionado pela crioterapia com nitrogênio líquido, pelas técnicas da sonda fechada, spray e derramamento direto do criógeno, bem como se mostrou eficiente na mensuração das medidas do diâmetro e profundidade de congelamento.
2. o congelamento propiciado pela técnica de aplicação do nitrogênio pela sonda fechada é o mais superficial, pois a profundidade corresponde, em média, a 72,7% do raio de congelamento.
3. os congelamentos gerados pelas técnicas de spray I (75 segundos), spray II (135 segundos) e derramamento direto do nitrogênio, são mais profundos, variando entre 82,6 e 88,4% do raio de congelamento.
4. em nenhuma das quatro técnicas a profundidade de congelamento foi equivalente ao raio de congelamento (100%)
5. a necrose obtida após o congelamento com sonda fechada é mais superficial (76,8% do raio da necrose), que aquela obtida pelos métodos de spray II (135 segundos) e do derramamento direto do nitrogênio.

6. em nenhuma das quatro técnicas a profundidade de necrose foi equivalente à plenitude do seu raio.
7. a proporção entre os volumes de tecido congelado e necrosado, se mantém, independentemente da técnica utilizada, sendo o tecido necrosado menor que o congelado.
8. a proporção entre os diâmetros de tecidos congelado e necrosado se mantém, independentemente da técnica utilizada, sendo o diâmetro da necrose menor que aquele do congelamento.
9. a proporção entre as profundidades de tecidos congelado e necrosado, se mantém, independentemente da técnica utilizada, sendo a profundidade da necrose menor que aquela do congelamento.
10. o método menos eficiente de crioterapia é o da aplicação de nitrogênio através da sonda fechada, pois oferece a menor relação profundidade de necrose em relação ao diâmetro de congelamento.
11. os métodos mais eficientes de crioterapia são os de aplicação, de nitrogênio, através do derramamento e spray II (135 segundos), pois oferecem a maior relação profundidade de necrose e o diâmetro de congelamento.
12. pode-se obter a medida necessária do diâmetro do congelamento, pré determinando-se a profundidade da necrose pretendida, pelas diferentes técnicas de aplicação do nitrogênio líquido:

sonda fechada - $Di = hf / 0,29$

spray I - $Di = hf / 0,31$

spray II - $Di = hf / 0,35$

derramamento - $Di = hf / 0,38$

13. as presentes avaliações possibilitam o maior conhecimento da técnica crioterápica aplicada à dermatologia veterinária, possibilitando um plano prévio de tratamento mais efetivo e adequado, aumentando o ansiado êxito terapêutico.

REFERÊNCIAS

- BAXTER, J. S. The machinery of veterinary cryosurgery. **Journal of Small Animal Practice**, v. 19, p. 27-34, 1977.
- BOJRAB, M. J. Veterinary cryosurgery: an overview. **Norden News**, v. 53, p. 16-20, 1978.
- BROWN, D. D.; ADAMS, R. D.; BRENER, C.; DOHERTY, M. N. The pathology of injury to nerve induced by cold. **Journal of Experimental Neurology**, v.4, p-305-312, 1975.
- BRYNE, M. D. Cryosurgical instrumentation. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 10, n. 4, p. 771-778, 1980.
- BURLEY, K. Cryosurgery: toy or tool? **In Practice**, v. 17, n. 10, p. 491-492, 1995.
- BUTTS, K.; DANIEL, B. L.; CHEN, L.; BOULEY, D. M.; WANSAPURA, J.; MAIER, S. E.; DUMOULIN, C.; WATKINS, R. Diffusion-weighted MRI after cryosurgery of the canine prostate. **Journal of Magnetic Resonance Imaging**, v. 1, p. 131-135, 2003.
- CASTRO, L. G. M.; SALEBIAN, A.; LACAZ, C. S. Células fúngicas permanecem viáveis por até doze dias em lesões de cromomicose tratadas pela ciocirurgia com nitrogênio líquido. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 78, n. 3, p. 279-282, 2003.
- CLARKE, R. E. Cryosurgical treatment of feline cutaneous squamous cell carcinoma. **Australian Veterinary Practice**, v. 21, n. 3, p. 148-153, 1991.
- COOPER, I. S. Criogenic surgery: a new method of destruction or extirpation of benign and malignant tissue. **New England Journal of Medicine**, v. 268, p. 743, 1963.
- DABAK, N.; TOMAK, Y.; PISKIN, A.; GULMAN, B.; OZCAN, H. Early results of a modified technique of cryosurgery, **International Orthopaedics**, v. 27, n.8, p. 249-253, 2003.
- DANIEL, B. L.; BUTTS, K.; BLOCK, W. F. Magnetic resonance imaging of frozen tissues: temperature-dependent MR signal characteristics and relevance for MR monitoring of cryosurgery. **Magnetic Resonance in Medicine**, v. 41, p. 627-630, 1999.

DAWBER, R. P. R. Cold kills! **Clinical Experimental Dermatology**, v.13, p.137-145, 1988.

DAWBER, R. Cryosurgery: unapproved uses, dosages, or indications. **Clinics in Dermatology**, v. 20, p. 563-570, 2002.

DAWBER, R. P. R. The use of cryosurgery in dermatology. In: KORPAN, N. N. **Basics of cryosurgery**. Slovenia: SpringerWienNewYork, 2001. p. 47-86

ESCUADERO, A. B.; RODRIGUEZ, R. R. P.; FUNEZ, F. A. Principios técnicos de la cirugía prostática (1º Parte). **Archivos Espanoles de Urologia**, v. 59, n. 10, p. 1089-1109, 2003.

FARRELL, R. K. Simplified cryotherapy. **Veterinary Medicine: Small Animal Clinician**, v. 73, p. 1377-1384, 1978.

FARRIS, H. E.; FRAUNFELDER, F. T.; FRITH, C. H. A simple cryosurgical unit for treatment of animal tumors. **Veterinary Medicine: Small Animal Clinician**, v. 70, p. 299-303, 1975.

FARRIS, H. E.; FRAUNFELDER, F. T.; FRITH, C. H. Cryosurgical treatment of canine perianal gland adenomas. **Canine Practice**, v. august, p. 34-37, 1976.

FOURNIAL, R.; TRAORÉ, A. S.; LAURENDEAU, D.; MOISAN, C. An analytic method to predict the thermal map of cryosurgery iceballs in MR images. **Transactions on Medical Imaging**, v. 23, n. 1, p. 122-129, 2004.

GAGE, A. A. Experimental cryogenic injury of the palate: observations pertinent to cryosurgical destruction of tumors. **Cryobiology**, v. 15, p. 415-421, 1978.

GAGE, A. A.; BAUST, J. Mechanisms of tissue injury in cryosurgery. **Cryobiology**, v. 37, n.8, p. 171-186, 1998.

GIANNONE, J. A. Cryotherapy for perianal and tail lesions. **Modern Veterinary Practice**, v. 66, n. 1, p. 35-38, 1985.

GILBERT, J. C.; RUBINSKY, B.; WONG, S. T. S.; BRENNAN, K. M.; PEASE, G. R.; LEUNG, P. P. Temperature determination in the frozen region during cryosurgery of rabbit liver using MR image analysis. **Magnetic Resonance Imaging**, v. 15, n. 6, p. 657-667, 1997.

GOLDSTEIN, R. S.; HESS, P. W. Cryosurgery of canine and feline tumors. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 12, p. 340-349, 1976.

GOLDSTEIN, R. S.; HESS, P. W. Cryosurgical treatment of cancer. **Veterinary Clinics of North America**, v. 7, n. 1, p. 51-64, 1977.

GOLOUBEFF, B.; OLIVEIRA, H. P. Tratamento criocirúrgico de tumores e de fístulas, em cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, n. 5, p. 463-470, 1999.

GOURLEY, I. M.; VASSEUR, P. B. **General small animal surgery**. Philadelphia: J.B. Lippincott Co., 1985. p. 929-939.

GRAHAN, G. F. Statistical data on malignant tumors in cryosurgery. **Journal of Veterinary Surgery and Oncology**, v.9, p. 238-246, 1983

GRANOV, A. M.; PROKHOROV, A. P.; PINAEV, G. P.; PROKHOROV, G. G.; VLASOVA, A. V. Experimental Cryosurgery. In: KORPAN, N.N. **Basics of cryosurgery**. Slovenia: SpringerWienNewYork, 2001. p. 15-23.

GREINER, T. P.; LISKA, W. D.; WITHROW, S. J. Cryosurgery. **Veterinary Clinics of North America**, v. 5, n. 3, p. 565-581, 1975.

HOFFMANN, N. E.; BISCHOF, J. C. The cryobiology of cryosurgical injury. **Urology**, v. 60, n. 2, p. 40-49, 2002.

HOLMBERG, D. L. Cryosurgical treatment of canine eyelid tumors. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 10, n. 4, p. 831-846, 1980.

HOMASSON, J. P. Cryosurgery: state of the art and perspectives in 2001. **Bulletin of the IIR**. v. 4, n.6, p.132-138, 2001.

HONG, JEN-SHIN; RUBINSKY, B. Patterns of ice formation in normal and malignant breast tissue. **Cryobiology**, v. 31, p. 109-120, 1994.

HOYT JR., R. F.; SEIM III, H. B. Veterinary cryosurgery: mechanisms of cell death, cryosurgical instrumentation, and cryogens. Part I. **The Compendium on Continuing Education**, p. 426-432, 1981.

KALBHEN, C. L.; SALOMON, C. G.; DUDIAK, C. M.; OLSON, M. C.; FLISAK, M. E.; FLANIGAN, R. C. Complications of prostate cryosurgery: CT findings in three patients. **Abdominal Imaging**, v. 23, p. 442-445, 1998.

KIRPENSTEIJN, J. Aural neoplasms. **Seminars in Veterinary Medicine and Surgery** (Small Animal), v. 8, n. 1, p. 17-23, 1993.

KORPAN N. N. Cryosurgery in the 21st Century. In: _____. **Basics of Cryosurgery**. Slovenia: SpringerWienNewYork, 2001. p. 3-8.

KORPAN, N. N.; ZHARKOV, J. V. Cryosurgery and Cryotechnology Future Safety in Medicine In: KORPAN, N. N. **Basics of Cryosurgery**. Slovenia: SpringerWienNewYork, 2001. p. 9-15.

KRAHWINKEL, D. J. Cryosurgical treatment of skin diseases. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 10, n. 4, p. 789-801, 1980.

KRAHWINKEL, D. J.; MERKLEY, D. F.; HOWARD, D. R. Cryosurgical treatment of cancerous and noncancerous diseases of dogs, horses, and cats. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 16, p. 201-207, 1976.

KUFLIK, E. G. Cryosurgery for skin câncer: 30-year experiene and cure rates. **Dermatologic Surgery**, v. 30, n. 2, p. 297-300, 2004.

KUFLIK, E. G.; GAGE, A. A.; LUBRITZ, R. R.; GRAHAN, G. F. History of dermatologic cryosurgery. **Dermatologic Surgery**, v. 26, p. 715-722, 2000.

KUSZYK, B. S.; BOITNOTT, J. K.; CHOTI, M. A. ; BLUENKE, D. A.; SHETH, S.; MAGEE, C. A.; HORTON, K. M.; ENG, J.; FISHMAN, E. K. Local tumor recurrence following hepatic cryoablation: radiologic-histopathologic correlation in a rabbit model. **Radiology**, v. 217, p. 477-486, 2000.

LANE, J. G. Practical cryosurgery: an introduction for small-animal Clinicians. **Journal of Small Animal Practice**, v. 15, p. 715-725, 1974a.

LANE, J. G. The clinical applications of cryosurgery in small animal practice. **The Veterinary Annual**, v. 14, p. 216-219, 1974b.

LAUGIER, P.; BERGER, G. Assessment of echography as a monitoring technique for cryosurgery. **Ultrasonic Imaging**, v. 15, p. 14-24, 1993.

LEE JR., F. T.; CHOSY, S. G.; LITTRUP, P. J.; WARNER, T. F.; KUHLMAN, J. E.; MAHVI, D. M. CT-monitored percutaneous cryoablation in a pig liver model: pilot study. **Radiology**, v. 211, p. 687-692, 1999.

LISKA, W. D.; WITHROW, S. Cryosurgical treatment of perianal gland adenomas in the dog. **Journal of the American Animal Hospital Association**. v. 14, p. 457-463, 1978.

LUCAS, R. 1999. **Crioterapia na clínica veterinária: Avaliação da praticidade, exeqüibilidade e efetividade em dermatoses de caninos e felinos**. 111f. (Tese Mestrado em Medicina Veterinária) Faculdade de Medicina veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

LUCAS, R.; LARSSON, C. E.; Crioterapia na clínica veterinária: avaliação da praticabilidade, exeqüibilidade e efetividade em dermatoses de caninos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 77, n. 3, p. 291-299, 2002.

MACY, D. W.; MACEWEN, E. G. **Clinical veterinary oncology**. Philadelphia : J.B. Lippincott, 1989. p. 157-166.

MAIA, M.; RIBEIRO, A. E. **Curso de criocirurgia**. São Paulo: centro de estudos dermatológicos Adolpho Carlos Linderberg - clínica de dermatologia da Santa Casa de São Paulo, 1997. 19 p. (Apostila)

MALA, T.; FRICH, L.; AURDAL, L.; CLAUSEN, O. P.; EDWIN, B.; SOREIDE, O.; GLADHAUG, I. Intraoperative contrast-enhanced MR-imaging as predictor of tissue damage during cryoablation of porcine liver. **Magnetic Resonance Imaging**, v. 21, p. 733-740, 2003.

MARQUES, L. A. C. **Criocirurgia: nossa experiência**. 1989. 83 f. Dissertação (Mestrado em Medicina) Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1989.

MERRICK, M. A.; JUTTE, L. S.; SMITH, M. E. Cold modalities with different thermodynamic properties produce different surface and intramuscular temperatures. **Journal of Athletic Training**, v. 38, n. 1, p. 28-33, 2003.

MYRER, J. W.; MYRER, K. A.; MEASOM, G. J.; FELLINGHAM, G. W.; EVERS, S. L. Muscle temperature is affected by overlying adipose when cryotherapy is administered. **Journal of Athletic Training**, v. 36, n. 1, p. 32-36, 2001.

NANDI, S. K.; HALDER, S.; GHOSH, D.; GUHA, S.; HAZRA, S.; DUTTAGUPTA, B.; SANKI, S. Successful cryosurgical treatment of adenocystic variety of basal cell tumor in dog. **Indian Veterinary Journal**, v. 79, p. 953-955, 2002.

NEEL, H.B.; KETCHAM, A.S.; HAMMOND, W.G.; MILLER, T. Requisites for successful cryogenic surgery of cancer. **Arch. of Surgery**, v.102, p. 45-52, 1971.

NORSWORTHY, G. D.; MILLER, D. C.; RADICKE, L. E.; LIMMER, B. L. Cryosurgery in small animal practice. **Canine Practice**, v. 4, n. 4, p. 18-22, 1977.

OGILVIE, G. K. Mysteries of feline skin tumors. In: Feline Median Symposium/North American Veterinary Conference. Jan.18, 1995. Vernon. **Proceedings**, v.1, p.50-54.

OWENS, J.M.; BIERY, D.N.. **Radiographic Interpretation for the Small Animal Clinician**. Baltimore-USA: Williams and Wilkins, 1999, 378p.

PIMENTEL, E. R. A. **Controle histológico pelo método micrográfico de Mohs em carcinoma basocelular tratado pela criocirurgia com nitrogênio líquido**. 151f. Dissertação (Doutorado em Medicina) Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.

PODKONJAK, K. R. Veterinary cryotherapy. 1. A comprehensive look at uses, principles, and successes. **Veterinary Medicine: Small Animal Clinician**, v. 77, p. 51-64, 1982a.

PODKONJAK, K. R. Veterinary cryotherapy. 2. A comprehensive look at uses, principles, and successes. **Veterinary Medicine: Small Animal Clinician**, v. 77, p. 183-290, 1982b.

POPKEN, F.; SEIFERT, J. K.; ENGELMANN, R.; DUTKOWSKI, P.; NASSIR, F.; JUNGINGER, T. Comparison of iceball diameter and temperature distribution achieved with 3-mm accuprobe cryoprobes in porcine and human liver tissue and human colorectal liver metastases in vitro. **Cryobiology**, v. 40, p. 302-310, 2000.

RABIN, Y. A general model for the propagation of uncertainty in measurements into heat transfer simulations and its application to cryosurgery. **Cryobiology**, v. 46, p. 109-120, 2003.

ROBERTS, S. M.; SEVERIN, G. A.; LAVACH, J. D. Prevalence and treatment of palpebral neoplasms in the dogs: 200 cases (1975-1983). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 189, n. 10, p. 135-59, 1986.

ROBINSON, D.; HALPERIN, N.; NEVO, Z. Two freezing cycles ensure interface sterilization by cryosurgery during bone tumor resection. **Cryobiology**, v. 43, p. 4-10, 2001.

RUBLEY, M. D.; DENEGAR, C. R.; BUCKLEY, W. E.; NEWELL, K. M. Cryotherapy, sensation, and isometric-force variability. **Journal of Athletic Training**, v. 38, n. 2, p. 113-119, 2003.

RUBINSKY, B.; PEASE, G. R.; WONG, S. T. S.; ROOS, M. S.; GILBERT, J. C.; ARAV, A. An integrated probe for magnetic resonance imaging monitored skin cryosurgery. **Journal of Biomechanical Engineering**, v. 117, p. 59-63, 1995.

RUBINSKY, B. Cryosurgery. **Annual Reviews in Biomedical Engineering**, v. 2, p. 157-187, 2000.

SALIKEN, J. C.; DONNELLY, B. J.; REWCASTLE, J. C. The evolution and state of modern technology for prostate cryosurgery. **Urology**, v. 60, n. 2, p. 26-33, 2002.

SANDISON, G. A. Future directions for cryosurgery computer treatment planning. **Urology**, v. 60, n. 2, p. 50-55, 2002.

SANDISON, G. A.; LOYE, A. P.; REWCASTLE, J. C.; HAHN, L. J.; SALIKEN, J. C.; McKINNON, J. G.; DONNELLY, B. J. X-ray CT monitoring of iceball growth and thermal distribution during cryosurgery. **Physics in Medicine and Biology**, v. 43, p. 3309-3324, 1998.

SAXE, N.; MCDONALD, D. **Cryosurgery**. The Speculum, v. 2, p. 17-22, 1976.

SEIFERT, J. K.; GERHARZ, C. D.; MATTES, F.; NASSIR, F.; FACHINGER, K.; BEIL, C.; JUNGINGER, T. A pig model of hepatic cryotherapy. In vivo temperature distribution during freezing and histopatological changes. **Cryobiology**, v. 47, p. 214-226, 2003.

SEIM III, H. B. Mechanisms of cold-induced cellular death. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 10, n. 4, p. 755-762, 1980.

SEIM III, H. B.; HOYT JR., R. F. Veterinary cryosurgery. Part II. Principles of application. **The Compendium on Continuing Education**, p. 695-702, 1982.

SHIBATA, K.; NAGATA, M.; AKAKUMA, O.; NANKO, H. Canine epidermal nevus treated with cryotherapy. **Veterinary Dermatology**, v. 13, n. 4, p. 211, 2002.

SILVERMAN, S. G.; TUNCALI, K.; ADAMS, D. F.; vanSONNENBERG, E.; ZOU, K. H.; KACHER, D. F.; MORRISON, P. R.; JOLESZ, F. A. MR imaging-guided percutaneous cryotherapy of liver tumors: initial experience. **Radiology**, v. 217, p. 657-664, 2000.

TACKE, J.; SPEETZEN, R.; HESCHEL, I.; HUNTER, D. W.; RAU, G.; GUNTHER, R. W. Imaging of interstitial cryotherapy - an in vitro comparison of ultrasound, computed tomography, and magnetic resonance imaging. **Cryobiology**, v. 38, p. 250-259, 1999.

TANAKA, S.; OHKUMA, T.; ISHII, Z. Experimental Cryoimmunology. In: KORPAN, N.N. **Basics of cryosurgery**. Slovenia: SpringerWienNewYork, 2001. p. 31-39.

THAI, K. E.; SINCLAIR, R. D. Cryosurgery of benign skin lesions. **Australian Journal of Dermatology**, v. 40, p. 175-186, 1999.

TRAORÉ, A. S.; GODBOUT, M. J.; SERRE, D.; YOUNAN, R. ; DIONNE, G.; DUFOUR, M.; MORIN, J. ; MOISAN, C. Improved image contrast with mangafodipir trisodium (MnDPDP) during MR-guided percutaneous cryosurgery of the liver. **Magnetic Resonance Imaging**, v. 21, p. 609-615, 2003.

WEI, J.; SANDISON, G. A.; CHEN, L.; LIANG, Y.; XU, L. X. X-ray CT high-density artifact suppression in cryosurgery. **Physics in Medicine and Biology**, v. 47, p. 319-326, 2002.

WITHROW, S. J. General principles of cryosurgical technique. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 10, n. 4, p. 779-786, 1980.

WITHROW, S. J. Cryosurgical therapy for nasal tumors in the dog. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 18, p. 585-589, 1982.

WITHROW, S. J., (Ed.) **Clinical veterinary oncology**. Philadelphia: J.B. Lippincott, 1989. p. 107-11.

WITHROW, S. J.; GREINER, T. R.; LISKA, W. D. Cryosurgery: veterinary considerations. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 11, p. 271-282, 1975.

YANG, W. H.; PENG, H. H.; CHANG, H. C.; SHEN, S. Y.; WU, C. L.; CHANG, C. H. An in vitro monitoring system for simulated thermal process in cryosurgery. **Cryobiology**, v. 40, p. 159-170, 2000.

ZACARIAN, S. A. Cryogenics: the cryolesion and the pathogenesis of cryonecrosis
In: _____. **Cryosurgery for skin cancer and cutaneous disorders**. St. Louis C.V. Mosby Company, 1985. p. 1-30.

ZHOU, L.; SHAO, Z.; OU, S. Cryoanalgesia: electrophysiology at different temperatures. **Cryobiology**, v. 46, p. 26-32, 2003.