DARIO GRECHI GOULART

**Estudo dos efeitos do laser infravermelho
sobre a retina fotocoagulada
vias transescleral e transpupilar em coelhos**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Oftalmologia

Orientador: Prof. Dr. Walter Yukihiro Takahashi

São Paulo

2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Goulart, Dario Grechi

Estudo dos efeitos do laser infravermelho sobre a retina fotocoagulada vias
transescleral e transpupilar em coelhos / Dario Grechi Goulart. -- São Paulo, 2008.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Departamento de Oftalmologia e Otorrinolaringologia.

Área de concentração: Oftalmologia.

Orientador: Walter Yukihiro Takahashi.

Descritores: 1.Lasers 2.Coelhos 3.Retina 4.Raios infravermelhos 5.Relção dose-
resposta em radiação

USP/FM/SBD-119/08

DEDICATÓRIA

A Deus, por tudo.

Aos meus filhos Bianca e Fabrício, por me fazerem querer ser melhor.

À minha esposa, Denise, por toda amizade e cumplicidade possíveis.
Exemplo de integridade e doação à família.

Aos meus pais, Goulart e Eliana, por valores de trabalho desde cedo transmitidos à minha formação. Grandes incentivadores e patrocinadores dos meus projetos e sonhos.

À minha avó Maria (*in memoriam*), segunda mãe, pelo legado de amor, simplicidade e sabedoria.

À Lucila, irmã querida e grande amiga de toda vida.

Aos meus sogros, Dr. Victor e Dna. Sandra, pais de coração, laços de convivência com a família Atique.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Walter Yukihiro Takahashi, chefe do Setor de Retina e Vítreo do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, orientador desta tese, pelo valiosíssimo voto de confiança, sempre com a colocação mais lúcida e serena nos momentos críticos.

Ao Dr. Ronaldo Yuti Sano, médico, fellow do Setor de Retina e Vítreo do Departamento de Oftalmologia da Santa Casa de São Paulo, pela amizade e prontidão durante os procedimentos técnicos e cirúrgicos desta tese.

Ao Sr. Jorge Fraga, engenheiro responsável pela Lepton Sistemas S.A., pela disponibilidade e competência na calibragem e checagem do sistema de digitalização de imagem utilizado nesta tese.

À Sra. Mitti Ayako Hara Koyama, responsável pelos extensos cálculos estatísticos.

À Dra. Sylvia Regina Temer Cursino, pós-graduanda, nível doutorado, do Departamento de Patologia do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, pela realização dos exames histopatológicos desta tese.

Ao Sr. Fernando Moacir Blanco, técnico responsável pela Opto Eletrônica S.A., pela disponibilidade e competência na calibragem e manutenção do Laser utilizado nesta tese.

Ao Sr. Elison Félix Lima, técnico responsável pela Lasercom Ltda, pelo fornecimento da sonda transescleral do laser utilizado nesta tese.

À Sra. Aline Ribeiro, assistente de pesquisas da Pharmaceutical Product Development do Brasil Ltda., responsável pelo fornecimento do DARC test-eye para calibragem do sistema de digitalização de imagem utilizado nesta tese.

Ao Prof. Dr. Mário Luiz Ribeiro Monteiro, coordenador do Programa de Pós-Graduação da Universidade de São Paulo, sempre disposto a auxiliar os pós-graduandos.

Ao Prof. Dr. Newton Kara-José, Prof. Titular do Departamento de Oftalmologia do Hospital da Universidade de São Paulo e UNICAMP, pela presença firme e constante na vida da graduação e pós-graduação do Departamento.

Ao Prof. Dr. Nilo Holzchuh, chefe do Setor de Córnea do Departamento de Oftalmologia da Santa Casa de São Paulo e UNICAMP, pela constante receptividade.

Ao Prof. Dr. Teruo Aihara, pela oportunidade, amizade e apoio incondicional no Setor de Retina e Vítreo da Santa Casa de São Paulo.

À Profa. Dra. Maria Cristina Nishiwaki-Dantas, Profa. Adjunta chefe do Departamento de Oftalmologia da Santa Casa de São Paulo, pelo exemplo de abnegação e dedicação ao Departamento.

Ao Prof. Dr. Geraldo Vicente de Almeida, Prof. Adjunto, chefe do Setor de Glaucoma do Departamento de Oftalmologia da Santa Casa de São Paulo, pela oportunidade de aprendizado e crescimento acadêmico e pelo exemplo de luta pela causa da Oftalmologia Brasileira, inspiração a todos ligados ao Departamento.

Ao Prof. Dr. Ralph Cohen, Prof. Adjunto do Setor de Glaucoma do Departamento de Oftalmologia da Santa Casa de São Paulo, pelos exemplos de honestidade e humildade e pela oportunidade de aprendizado.

À Sra. Regina Ferreira de Almeida, secretária da Pós-Graduação do Departamento de Oftalmologia do Hospital das Clínicas da USP, sempre atenciosa, paciente, amiga e disposta a ajudar.

À Santa Casa de Misericórdia, minha segunda casa, por toda minha formação médica e oftalmológica; a todos os professores, mestres, colegas e pacientes que participaram de meu aprendizado.

"O pensamento é mais que um direito, é o próprio alento do homens.

Victor Hugo

NORMATIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Júlia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2^a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de siglas

Lista de símbolos

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Histórico	2
1.2. Concepção	3
1.3. Primeiros aparelhos	3
1.4. Papel do LDI na Oftalmologia	5
1.5. Limitações e alternativas terapêuticas	7
1.6. Possibilidades do tratamento transescleral	8
2. OBJETIVOS	10
3. MÉTODOS	12
3.1. Desenho do estudo	13
3.2. Animais de experimentação	13
3.3. Técnica cirúrgica	14
3.4. Determinação dos parâmetros	17
3.5. Retinografias e mensurações	20
3.6. Microscopia de luz	22
3.7. Método de análise estatística	23
4. RESULTADOS	26
4.1. Retinografias imediatas	27
4.2. Retinografias após quatro semanas	28
4.3. Microscopia de luz	29
4.3.1. Lesões causadas por FRT (grupo de estudo)	30
4.3.2. Lesões causadas por FRP (grupo controle)	35
4.4. Análise descritiva dos dados	39
4.5. Comparação das médias das PPO por potência e tempo	42
4.6. Análise da reprodutibilidade	45
5. DISCUSSÃO	47
6. CONCLUSÕES	59
7. ANEXOS	61
8. REFERÊNCIAS	71

LISTAS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1a -	Aplicação transescleral do laser no coelho pigmentado	15
Figura 1b -	Ilustração esquemática da aplicação transescleral do laser	15
Figura 2a -	Oftalmoscópio Indireto	15
Figura 2b -	Lente oftalmoscópica	15
Figura 3a -	Sonda transescleral de diopexia	16
Figura 3b -	Sonda transescleral de diopexia ativada	16
Figura 3c -	Fotocoagulador de diodo semiconductor	16
Figura 4 -	Aplicação transpupilar do laser nos coelhos	20
Figura 5a -	Adaptador para o fotocoagulador da lâmpada de fenda	21
Figura 5b -	Lente de contato para aplicação do laser	21
Figura 5c -	Retinógrafo digitalizado	21
Figura 5d -	Olho virtual esquemático de Gullstrand	21
Figura 6a -	Retinografia ilustrativa pré-medicação	22
Figura 6b -	Retinografia ilustrativa pós-medicação e classificação	22
Figura 7a -	Retinografia ilustrativa após quatro semanas da FRT	28
Figura 7b -	Retinografia ilustrativa após quatro semanas da FRP	28
Figura 8 -	Retinografia ilustrativa com alteração do padrão crônico	29
Figura 9 -	Corte histológico da retina normal	30
Figura 10 -	Corte histológico de classificação clínica grau 1 por FRT	31
Figura 11 -	Corte histológico de classificação clínica grau 2 por FRT	32
Figura 12 -	Corte histológico de classificação clínica grau 2 por FRT	33
Figura 13 -	Corte histológico de trombose coriocapilar por FRT	34
Figura 14 -	Corte histológico de classificação clínica grau 3 por FRT	35

Figura 15 - Corte histológico de classificação clínica grau 3 por FRP	36
Figura 16 - Corte histológico fora dos limites terapêuticos da FRP	37
Figura 17 - Corte histológico de aderência vítreo-retiniana por FRP	37
Figura 18 - Corte histológico mostrando DR artefactual	38
Figura 19a - Retinografia ilustrativa do coelho 1 imediatamente após FRT	62
Figura 19b - Retinografia ilustrativa do coelho 1 imediatamente após FRP	62
Figura 20a - Retinografia ilustrativa do coelho 2 imediatamente após FRT	63
Figura 20b - Retinografia ilustrativa do coelho 2 imediatamente após FRP	63
Figura 21a - Retinografia ilustrativa do coelho 3 imediatamente após FRT	64
Figura 21b - Retinografia ilustrativa do coelho 3 imediatamente após FRP	64
Figura 22a - Retinografia ilustrativa do coelho 4 imediatamente após FRT	65
Figura 22b - Retinografia ilustrativa do coelho 4 imediatamente após FRP	65
Figura 23a - Retinografia ilustrativa do coelho 5 imediatamente após FRT	66
Figura 23b - Retinografia ilustrativa do coelho 5 imediatamente após FRP	66
Figura 24a - Retinografia ilustrativa do coelho 6 imediatamente após FRT	67
Figura 24b - Retinografia ilustrativa do coelho 6 imediatamente após FRP	67
Figura 25a - Retinografia ilustrativa do coelho 7 imediatamente após FRT	68
Figura 25b - Retinografia ilustrativa do coelho 7 imediatamente após FRP	68

Figura 26a - Retinografia ilustrativa do coelho 8 imediatamente após FRT	69
Figura 26b - Retinografia ilustrativa do coelho 8 imediatamente após FRP.....	69
Figura 27a - Retinografia ilustrativa do coelho 9 imediatamente após FRT	70
Figura 27b - Retinografia ilustrativa do coelho 9 imediatamente após FRP.....	70
Gráfico 1 - Intervalo de Confiança de 95% para as médias de PPO	40
Gráfico 2 - Gráfico de caixas da PPO (%) por tempo e potência	41
Gráfico 3 - Estimativa da Média Marginal da PPO (%).....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Medidas – resumo da PPO (%) por tempo e potência.....	39
Tabela 2 -	Análise de Variância para comparação de médias.....	42
Tabela 3 -	Média e Desvio padrão para PPO (%) por potência segundo os tempos de aplicação	43
Tabela 4 -	Comparação múltipla de C de Dunnett.....	44
Tabela 5 -	Distribuição dos graus de lesão transescleral: 1ª medida e 2ª medida com equivalência parcial de lesões	46
Tabela 6 -	Medidas aferidas após aplicação do laser no coelho 1	62
Tabela 7 -	Medidas aferidas após aplicação do laser no coelho 2	63
Tabela 8 -	Medidas aferidas após aplicação do laser no coelho 3	64
Tabela 9 -	Medidas aferidas após aplicação do laser no coelho 4	65
Tabela 10 -	Medidas aferidas após aplicação do laser no coelho 5	66
Tabela 11 -	Medidas aferidas após aplicação do laser no coelho 6	67
Tabela 12 -	Medidas aferidas após aplicação do laser no coelho 7	68
Tabela 13 -	Medidas aferidas após aplicação do laser no coelho 8	69
Tabela 14 -	Medidas aferidas após aplicação do laser no coelho 9	70

LISTA DE SÍMBOLOS

dp _{tr}	dioptria
mg/kg	miligrama por quilograma
mm	milímetro
mm ²	milímetro quadrado
ms	milissegundo
mW	miliwatt
nm	nanômetro
UV	ultravioleta
W	watt
μm	micrômetro

LISTA DE SIGLAS

ANOVA	análise de variância
CEEA	Comissão de Ética em Experimentação Animal
DARC	Digital Angiography Reading Center
DR	Descolamento da Retina
DVP	Descolamento do Vítreo Posterior
EPR	Epitélio Pigmentado da Retina
FRP	Fotocoagulação Retiniana Transpupilar
FRT	Fotocoagulação Retiniana Transescleral
HE	Hematoxilina-eosina
LASER	Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation
MASER	Microwave Amplification by Stimulated Emission of Radiation
OD	Olho Direito
OE	Olho Esquerdo
Pe	concordância esperada
Po	concordância observada
PPO	Permeabilidade da Parede Ocular à Ação do Laser

RESUMO

Goulart DG. *Estudo dos efeitos do laser infravermelho sobre a retina fotocoagulada vias transescleral e transpupilar em coelhos* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008. 82 p.

OBJETIVOS: A fotocoagulação retiniana transpupilar (FRP) tem seu uso, freqüentemente, limitado nos casos de opacidade acentuada dos meios oculares, situações nas quais pode-se empregá-la via transescleral. O presente estudo teve como objetivo realizar pesquisa experimental com o laser de diodo semiconductor infravermelho (LDI), a fim de estimar a reprodutibilidade, a segurança e a permeabilidade da parede ocular à sua atuação clínica (PPO), quando aplicado nesta técnica. **MÉTODOS:** Submeteram-se 18 olhos de 9 coelhos pigmentados, todos integrantes da raça Nova Zelândia (*Oryctolagus cuniculus*), à fotocoagulação retiniana por LDI. No olho direito (OD) desses animais, realizou-se fotocoagulação via transescleral (FRT) sob parâmetros de potência e tempo pré-determinados clinicamente. No olho esquerdo (OE), foram repetidos os mesmos valores da potência e tempo usados no OD, mas, desta vez, sob uso da técnica da FRP. Passados 15 minutos das aplicações e após quatro semanas, estudos clínicos, baseados na retinografia, e histopatológicos foram realizados. **RESULTADOS:** Existe uma constante de PPO durante aplicação da FRT, cuja taxa varia de 58,95 a 63,87%. Observou-se que a média da PPO sob 300 mW (63,14%) é significativamente superior àquela encontrada sob 500 mW (59,11%), com significância de 5%. **CONCLUSÕES:** Este estudo sugere a existência da relação dose-resposta em relação aos parâmetros empregados na FRT, com PPO mensurável e boa reprodutibilidade clínica. Nenhuma rotura, hemorragia ou descolamento da retina (DR) foi constatado aos exames subseqüentes às aplicações do LDI, o que torna o uso do método viável e seguro no modelo experimental.

DESCRITORES: 1.Laser; 2.Coelho; 3.Retina 4. Raios infravermelhos 5.Relação dose-resposta em radiação.

SUMMARY

Goulart DG. *Experimental analysis of photocoagulated retina using transscleral and transpupillary infrared laser* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2008. 82 p.

PURPOSE: Recurrently retinal photocoagulation under poor visualization condition is often required. Transscleral delivery of infrared laser can be used as an alternative to standard transpupillary treatment. Based upon clinical aspects and retinographic measurements, we proposed to estimate reproducibility as well as ocular wall permeability rate for this treatment. Our primary goal was to evaluate whether this technique can deliver adequate photocoagulation at predetermined parameters. **METHODS:** In New Zealand pigmented rabbits, optimal transscleral infrared diode laser settings were administered to the right eye. With the same parameters, transpupillary photocoagulation was repeated to the left eye. Retinographic and clinical examinations were performed immediately and four weeks later. **RESULTS:** Ocular wall permeability rate varied between 58.95 and 63.87%. Average permeability using power of 300 mW (63.14%) was found to be higher than that encountered before its enhancement up to 500 mW (59.11%), ($P < 0.05$). **CONCLUSIONS:** Setting parameters showed dose-response effect. No retinal hole or retinal detachment was noticed in any rabbit. Transscleral infrared photocoagulation appeared to be a feasible, reproducible and secure method in the experimental model.

DESCRIPTORS: 1.Laser 2.Rabbit 3.Retina 4. Infrared rays 5.Dose-response relationship, radiation.

1 INTRODUÇÃO

1.1 HISTÓRICO

Conceitos primitivos daquilo que, hoje, entende-se por laser (do acrônimo de “light amplification by stimulated emission of radiation”), fizeram-se presentes na história da humanidade desde a antiguidade. Naquele período, o primeiro uso militar de fonte de luz coesiva foi relatado em 215 a.C., no qual soldados gregos derrotaram uma esquadra de navios romanos, provocando o incêndio de suas velas, ao focar luz solar refletida por espelhos de bronze, idealizados pelo matemático grego Arquimedes [1].

As observações originais vinculadas, hoje, aos conceitos de fotocoagulação são reputadas, há muito, ao filósofo grego Sócrates, ao advertir que, para que se pudesse observar um eclipse solar, seria necessário o uso de algum meio protetor, não se podendo observá-lo diretamente, a fim de se evitar danos visuais irreparáveis [2, 3].

Durante a idade média, a filosofia aristotélica, segundo a qual a luz seria originada dos olhos dos seres humanos, esteve presente e dominante em toda a Europa. Após o período, Newton, Copérnico e Kepler lançaram as bases da física moderna que, embora elucidativas, ainda não eram capazes de explicar a natureza eletromagnética da luz [1].

1.2 CONCEPÇÃO

Em 1917, a partir da lei de Max Planck, precursora da teoria quântica, Albert Einstein lançou a teoria da emissão estimulada. De conceito demasiado vanguardista para a época em que foi concebida, a teoria permaneceu esquecida até o final da Segunda Guerra Mundial. A partir de então, passou a servir de fundamento para a invenção do primeiro emissor de luz no espectro invisível ao olho humano (microondas), conhecido como maser (do acrônimo de “microwave amplification by stimulated emission of radiation”), por Charles Townes e Arthur Schawlow, e de seu sucessor, o laser, emissor de luz no espectro visível.

Na época, a invenção, que mudou radicalmente o mundo em que se vive, foi descrita como uma “solução à procura de um problema” [1, 4].

1.3 PRIMEIROS APARELHOS

A terapêutica que emprega os recursos do laser no tratamento e propedêutica das doenças oculares deu novo horizonte à medicina, particularmente, à Oftalmologia, e vem sendo aplicada nesta especialidade há mais de 50 anos. Estudos iniciais nesse sentido indicam tentativas infrutíferas de utilizar a luz solar focada, como fonte de energia na prática clínica [5, 6]. Foram tais estudos, entretanto, que viabilizaram a construção

do primeiro fotocoagulador, clinicamente viável, de gás xenônio, pelo genial oftalmologista alemão Gerd Meyer-Schwickerath, em 1949, após constatar, perspicazmente, a ausência de progressão da retinopatia diabética em olhos acometidos por cicatrizes de coriorretinite. Tal fotocoagulador veio a se tornar importante precursor terapêutico no tratamento de doenças vasculares da retina na década seguinte [5, 7].

Foi, no entanto, somente em 1960, quase meio século após a teoria quântica, que o físico Theodore Harold Maiman, posteriormente agraciado com dois prêmios Nobel, conseguiu desenvolver instrumento terapêutico mais refinado, com a capacidade de focalizar miras menores e emitir energia de forma mais prática, segura e controlável. Aquele aparato gerava luz monocromática altamente coesiva, em tempo e espaço, a partir do cristal vermelho: o fotocoagulador de laser de rubi, de comprimento de onda igual a 694,3 nm [8]. Embora relativamente eficaz ao produzir aderência coriorretiniana no tratamento do descolamento da retina (DR), mostrou resultados decepcionantes no tratamento de suas enfermidades vasculares [9].

No início da década de 70, três grupos de pesquisadores, trabalhando independentemente, desenvolveram o fotocoagulador que produzia laser de argônio azul (488 nm), para o uso clínico na Oftalmologia. O primeiro deles foi L'Esperance, em Nova York, logo seguido por Zweng, em Palo Alto, e por Patz, em Baltimore, todos nos EUA [6, 10, 11]. Esse fotocoagulador tornou-se comercializável em 1971 e passou a ser o mais difundido e utilizado, devido à sua alta eficácia e aplicabilidade em,

praticamente, todas as doenças da retina, muito embora seu comprimento de onda fosse inadequado à aplicação macular [12].

Na seqüência desses avanços, surgiu o laser de criptônio, (647 nm), menos iatrogênico no tratamento de doenças do pólo posterior, por não ser absorvido pelos pigmentos de xantofila presentes na mácula [13]. Logo após, o laser de cor variável (“dye laser”), que permitiu ao usuário a capacidade de selecionar o comprimento de onda desejada, de acordo com a cor do espectro de luz visível. O sistema, como comprovado posteriormente, não se mostrou capaz de disponibilizar ao médico a seletividade de tecidos alvo sugerida na teoria, não tendo atingido a popularidade esperada [14].

1.4 PAPEL DO LDI NA OFTALMOLOGIA

Os aparelhos feitos de diodo semicondutor que emitem laser infravermelho, os chamados lasers de diodo semicondutor infravermelho (LDI), cuja amplitude de onda varia entre 795 e 860 nm (nanômetro), não mais representam tecnologia de ponta, já que há muito vêm sendo empregado nas telecomunicações, soldas eletrônicas, discos compactos e leitura das fitas magnéticas em supermercados [9, 15]. Entretanto, é correto dizer que a introdução do LDI na Oftalmologia, na forma de fotocoagulador, é relativamente recente [16-18].

O LDI, por ser invisível, já que se trata de “luz em forma de calor”, utiliza, como luz de mira, outro laser de diodo, cujo comprimento de onda é próximo a 670 nm, visível ao olho humano. Frente a outros fotocoaguladores habitualmente usados nesta especialidade, foi verificado que sua amplitude de onda infravermelha permite que tenha maior penetração com menores efeitos fotoquímicos, de dispersão e de absorção nos meios intra-oculares parcialmente opacificados, tais como cataratas moderadas e turvação parcial do vítreo [16, 17, 19, 20]. Portanto, graças às suas características infravermelhas, pode ser mais apropriado a determinados tratamentos que empregam a fotocoagulação retiniana transpupilar (FRP), quando comparado a outros tipos de laser [21].

Apresenta, teoricamente, comprimento de onda adequado ao tratamento das maculopatias por, a exemplo do laser de criptônio, não ser absorvido pela xantofila presente na área macular [18]. Penetra bem no espaço sub-retiniano e tem captação razoável por tecidos oculares pobres em pigmento melânico. Seu principal sítio de absorção é o epitélio pigmentado da retina (EPR) [6, 17, 22, 23].

Sua eficácia tem sido comprovada por inúmeros estudos clínicos para o tratamento das doenças do segmento posterior, tais como retinopatia diabética, oclusão da veia central da retina ou dos seus ramos, retinopatia da prematuridade, DR periférico, tumores da coróide e neovascularização sub-retiniana [24-31].

1.5 LIMITAÇÕES E ALTERNATIVAS TERAPÊUTICAS

Não obstante, freqüentemente, a eficácia do LDI permanece limitada nos casos de opacidades mais acentuadas dos meios oculares, comuns na periferia de implantes de lentes intra-oculares, na retinopatia da prematuridade, nas roturas hemorrágicas da retina, no hemovítreo periférico decorrente da retinopatia diabética, após oclusões de veia central ou de seus ramos retinianos, na presença de edema de córnea e no glaucoma neovascular, dentre outras situações, nas quais, em virtude das condições de baixa visibilidade, surge a necessidade de se optar por outra modalidade de tratamento [32].

Para o tratamento destes casos, a alternativa terapêutica mais difundida à FRP é a crioterapia que, no entanto, induz maior inflamação, às vezes causa hemorragia da coróide, necessita dissecação escleral e conjuntival, apresenta baixa precisão de foco e ainda ocasiona grande dispersão de pigmentos do EPR quando comparada à aplicação do LDI na forma de fotocoagulação retiniana transescleral (FRT) [28, 33-35]. Cabe lembrar que outra possibilidade de tratamento seria a cirurgia vítreo-retiniana, técnica cruenta, não isenta de complicações, tais como recorrência de hemorragia vítrea, cujas taxas podem atingir 75% em diabéticos [32].

Devido à sua fácil penetração através da esclera, a FRT tem sido útil no tratamento, já consagrado, do glaucoma refratário, causando atrofia do corpo ciliar após ciclofotocoagulação transescleral [36-38].

1.6 POSSIBILIDADE DO TRATAMENTO TRANSESCLERAL

Frente às dificuldades inerentes ao uso da FRP, à crioterapia e à cirurgia vítreo-retiniana e, considerando-se a fácil penetração do LDI através da esclera [38], realizou-se estudo experimental em olhos de coelhos após aplicação do LDI vias transescleral e transpupilar.

Clinicamente, foi possível compará-las. Ao fazê-lo, procurou-se confrontar o resultado da aplicação do LDI via transpupilar com a FRT. Partiu-se do princípio de que o LDI tem sua eficiência parcialmente dissipada pela parede ocular e buscou-se estimar o que se denominou permeabilidade da parede ocular à atuação clínica do LDI via transescleral (PPO) [39].

Almejou-se, desta forma, estimar o efeito do laser, quando dissipado pela parede ocular durante a FRT, dentro dos limites considerados, sob o aspecto clínico e histopatológico, seguros.

As questões que nortearam os objetivos deste experimento podem ser formuladas no que segue:

Existe reprodutibilidade clínica da FRT, dentro dos parâmetros utilizados? Se esta reprodutibilidade existe, quais seriam os parâmetros seguros, do ponto de vista clínico e histopatológico para a aplicação do laser transescleral?

Existe uma “constante” da permeabilidade da parede ocular quando utilizados diferentes parâmetros para a aplicação do laser

transescleral? Se esta “constante” existe, qual seria a taxa de permeabilidade encontrada?

Existe influência dos parâmetros de tempo ou potência sobre a aparência clínica da FRT? Caso esta influência exista, de que modo ela acontece?

Considerando-se a freqüente impossibilidade da aplicação direta, transpupilar, do LDI sobre a retina, seja por baixa visibilidade ou por simples obstrução óptica deste, devido à opacidade dos meios, o estudo tornou-se pertinente face ao desconhecimento da absorção da parede ocular durante aplicação via transescleral desse laser, alternativa esta, como dito anteriormente, empregada, com vantagens, em relação ao tratamento crioterápico clássico.

Do ponto de vista prático, seria valioso conseguir marcas de fotocoagulação, via transescleral, semelhantes àsquelas produzidas via transpupilar, tanto a curto prazo (agudas), quanto a longo (crônicas), para que se chegasse ao mesmo resultado terapêutico na retina tratada.

2 OBJETIVOS

Mensurar a taxa de permeabilidade, do ponto de vista clínico, da parede ocular (PPO), durante a aplicação do LDI via transescleral, em relação àquela que ocorre via transpupilar, bem como a segurança e reprodutibilidade clínica da FRT.

3 MÉTODOS

3.1 DESENHO DO ESTUDO

A fim de se avaliarem os efeitos dos parâmetros tempo e potência de aplicação sobre a retina fotocoagulada vias transescleral e transpupilar, dentro de parâmetros seguros, dos pontos de vista clínico e histopatológico, optou-se por estudo experimental, comparativo, controlado, entre um grupo de olhos de coelhos submetidos à FRP (grupo controle) e outro à FRT (grupo de estudo).

Para estudá-los, utilizaram-se a retinografia e o exame histológico com microscopia de luz.

3.2 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

A amostra constou de 18 olhos de 9 coelhos adultos, da raça Nova Zelândia (*Oryctolagus cuniculus*), pigmentados, machos, com peso variando entre 2,5 e 3 kg, todos procedentes do Biotério do Departamento de Cirurgia Experimental da Santa Casa de São Paulo, mantidos em gaiolas individuais, alimentados com ração e complementação dietética, e água *ad libitum*.

Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados por um mesmo cirurgião (R. Y. S.), no Setor de Retina e Vítreo do Departamento de Oftalmologia da Santa Casa de São Paulo, e respeitaram as resoluções das normas de ética da Associação para Pesquisa da Visão em Oftalmológica dos EUA (Association for Research in Vision and Ophthalmology, 2000).

O protocolo do presente estudo obteve aprovação, sem restrições, da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) da Santa Casa de São Paulo, com posterior revisão e aprovação pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, de acordo com a Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10 de outubro de 1996.

3.3 TÉCNICA CIRÚRGICA

Os animais de experimentação tiveram as pupilas de ambos os olhos dilatadas previamente aos procedimentos cirúrgicos com tropicamida a 1% e cloridrato de fenilefrina a 10%, na forma de colírio, na quantidade de duas gotas em cada olho, com intervalo de 10 minutos entre estas.

Em seguida, os coelhos foram anestesiados com injeção intramuscular de cloridrato de cetamina a 5% (Parke & Davis®), na dosagem de 10 mg/kg associado a cloridrato de xilazina a 2% (Bayer®), na dosagem de 2 mg/kg.

Para FRT, cada animal foi posicionado em decúbito lateral esquerdo para aplicação do laser no seu olho direito (OD) (figura 1a), de maneira semelhante à ilustração esquemática (figura 1b). A iluminação foi gerada e monitorada com uso do oftalmoscópio indireto Keeler All Pupil II (Keeler Instruments Inc®) (figura 2a) .

Figura 1 - Decúbito lateral esquerdo do animal para aplicação do laser via transescleral no OD (1a); ilustração esquemática da aplicação transescleral do laser, cortesia da Lasercom Ltda (representante IRIDEX Corporation®, EUA), correspondente ao tratamento de DR (1b)

Figura 2 - Oftalmoscópio indireto Keeler All Pupil II (Keeler Instruments Inc®) (2a); lente de 22 dptr Volk Pan Retinal 2.2 (Volk Optical Inc®) utilizada (2b)

Com auxílio de lente de 22 dptr Volk Pan Retinal 2.2 (Volk Optical Inc®) (figura 2b), utilizou-se a sonda de diopexia transescleral IRIS Medical DioPexy Probe (IRIDEX Corporation®) (figuras 3a e 3b), com diâmetro de 1000 μm , acoplada ao aparelho emissor do laser infravermelho, o fotocoagulador de diodo semiconductor modelo FTC – 2000 (Opto Eletrônica S.A.) (figura 3c), com comprimento de onda de 810 nm e potência máxima de 2000 mW.

Figura 3 - Sonda de diopexia transescleral IRIS Medical DioPexy Probe (IRIDEX Corporation®) empregada (3a); sonda transescleral ativada (3b); fotocoagulador de diodo semiconductor modelo FTC – 2000 (Opto Eletrônica S.A.) (3c)

Guiando-se por transiluminação da ponta da sonda de diopexia utilizada, foram geradas 30 marcas de FRT. As marcas situaram-se nos quadrantes nasal inferior e superior, próximas ao equador do olho, entre 3 e 6 mm dos limites do limbo corneano, com espaçamento mínimo, entre elas, equivalente ao tamanho do seu diâmetro.

Com relação à nomenclatura do procedimento, aqui denominado “transescleral”, deu-se preferência a este termo, já consagrado

pelo uso, ao invés de “transconjuntival”. Muito embora, a rigor, correspondam a técnicas distintas, não foi evidenciada, na literatura consultada, diferença, estatisticamente significativa, entre as características clínico-patológicas e dimensionais das lesões retinianas (e do restante da parede ocular) provocadas por um e outro método, excetuando-se leve quemose nas primeiras 72 h, por ocasião do tratamento transconjuntival [40].

A despeito do método empregado não ter incluído a dissecação conjuntival, tal quemose não foi notada nesta pesquisa, possivelmente porque foi utilizada a sonda de diopexia de ponta poligonal aplanada, menos agressiva à conjuntiva, mais recente e adequada à esta modalidade de tratamento do que aquelas utilizadas em outros estudos [26, 40].

3.4 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS

Antes dos procedimentos, para que se estabelecesse o limite inferior dos parâmetros de fotocoagulação, utilizou-se um coelho “piloto”, em cuja retina intentaram-se produzir marcas de fotocoagulação discerníveis por FRT. A partir de 100 ms e 100 mW, aumentaram-se os parâmetros, alternadamente, até que as primeiras marcas atingiram o grau 1 do critério de correlação clínico-patológica introduzido por Tso et al, em 1977 [41].

Segundo tal critério, adaptado ao uso do LDI, marcas de fotocoagulação são referidas como pertencentes ao grau 1 quando, à

oftalmoscopia, apresentam-se levemente acinzentadas em sua totalidade, pertencentes ao grau 2, quando contêm centro branco, circundado por halo acinzentado e, ao grau 3, quando apresentam centro branco, distinto, circundado por fino halo acinzentado [26, 41].

Conseqüentemente, encontraram-se, como parâmetros de tempo e potência de aplicação, limítrofes inferiores, respectivamente, 500 ms e 300 mW, ou seja, abaixo de quaisquer destes parâmetros, nenhuma marca de fotocoagulação visível à oftalmoscopia pôde ser produzida. De maneira análoga, gradualmente aumentou-se o parâmetro de potência até 600 mW, situação na qual a aparência clínica de algumas marcas geradas ultrapassou o grau 3 proposto pelo critério supra citado. Assim sendo, reputou-se 500 mW o valor limítrofe superior do emprego da potência.

De maneira análoga, a partir da potência 300 mW, gradualmente, aumentou-se o parâmetro de tempo até 1000 ms, situação na qual a aparência clínica de algumas marcas geradas também ultrapassou o grau 3 proposto por aquele critério. Dessa forma, julgou-se esse, o valor limítrofe superior do tempo de aplicação do LDI.

Potências que excederam 500 mW ultrapassaram o grau 3 clínico e foram, portanto, descartadas; o mesmo ocorreu com os tempos acima de 1000 ms.

Portanto, dividiram-se os coelhos em três grupos, cada qual contendo três coelhos. No primeiro grupo, manteve-se constante o tempo de 500 ms; no segundo, 800 ms e no terceiro, 1000 ms. Dentro de cada grupo,

variou-se a potência, igualmente, entre 300, 400 e 500 mW; somente se fez uma única combinação de parâmetros em cada coelho. A saber, no primeiro grupo de três coelhos pigmentados, foi mantido constante o tempo de 500 ms e variada a potência entre 300, 400 e 500 mW, respectivamente. No segundo, foi mantido constante o tempo de 800 ms e igualmente variada a potência entre 300, 400 e 500 mW e, no terceiro (e último), foi mantido constante o tempo de 1000 ms e igualmente variada a potência entre 300, 400 e 500 mW.

No olho esquerdo (OE) dos coelhos, em região análoga à do OD, foi repetida a mesma quantidade de queimaduras, sob os mesmos parâmetros de potência e tempo empregados no OD, mas, desta vez, com uso da FRP. Tal técnica consistiu na aplicação do LDI com uso de lâmpada de fenda tipo Haag Streit modelo SL – 3E (Topcon®) acoplada ao laser (figura 4) pelo Adaptador de Lâmpada de Fenda (Opto®) (figura 5a), sob mira de 500 μ m de diâmetro e auxílio da lente fundoscópica de contato Super Quad 160° (Volk®) (figura 5b), com capacidade para ampliação do mira em 2X, o que resultou numa mira final de 1000 μ m de diâmetro, dimensão esta, que objetivou proporcionar área de aplicação do LDI o mais próximo possível àquela fotocoagulada durante a FRT no OD.

Figura 4 - Aplicação do laser via transpupilar, com uso da lâmpada de fenda tipo Haag Streit modelo SL – 3E (Topcon®)

3.5 RETINOGRAFIAS E MENSURAÇÕES

Após o tempo mínimo necessário para que surgissem marcas de fotocoagulação bem discerníveis na retina dos animais, procederam-se às medições retinográficas das áreas por elas delimitadas. Neste período, os animais ainda se encontravam torporosos, o que facilitou sua imobilização.

O aparelho utilizado para captura da imagem e subsequente medição das áreas fotocoaguladas foi o retinógrafo TRC 50X Retinal Câmera (Topcon®) digitalizado pelo sistema Lepton Lite versão 2.1.7 (Lepton®) (figura 5c). O sistema foi devidamente calibrado, antes de se iniciarem as medições, com auxílio do mesmo olho virtual de teste para

calibragem utilizado no protocolo do “Digital Angiography Reading Center” (DARC), baseado no modelo esquemático de Gullstrand (figura 5d).

Para cada marca de fotocoagulação, dois posteriores tracejados para mensuração foram manualmente elaborados, com uso de dispositivo periférico de apontamento (“mouse”), respectivamente, por dois observadores distintos. Dessa forma, foi possível obter o valor final, de cada uma das áreas, a partir da média aritmética entre essas duas medidas. (figura 6).

Figura 5 - Adaptador de Lâmpada de Fenda (Opto®), com mira fixada em 500 μm (5a); lente fundoscópica de contato Super Quad 160° (Volk®) (5b); retinógrafo TRC 50X Retinal Câmera (Topcon®) digitalizado pelo sistema Lepton Lite versão 2.1.7 (Lepton®) (5c); olho virtual de teste para calibragem “test-eye”, baseado no modelo esquemático de Gullstrand (5d)

Os animais foram observados, diariamente, por oftalmoscopia indireta durante uma semana. Porém, somente após completadas quatro semanas dos procedimentos, optou-se por tomar novas retinografias, imobilizando-se os animais manualmente, para, logo em seguida, sacrificá-los sob anestesia profunda, enucleá-los e proceder-se ao exame histopatológico sob microscopia de luz.

Figura 6 – Retinografias do coelho 8 sem o tracejado que delimitou as área das marcas de FRT (**6a**); exemplo de retinografia com o tracejado que delimitou as áreas das marcas de FRT (**6b**); avaliação de correlação clínico-patológica grau 1 (seta azul), avaliação de correlação clínico-patológica grau 2 (seta amarela), avaliação de correlação clínico-patológica grau 3 (seta vermelha); potência de 1000 ms e tempo de 400 mW

3.6 MICROSCOPIA DE LUZ

Os olhos, já enucleados, foram identificados e fixados numa solução de formaldeído a 10% durante 48h e seccionados na região nasal inferior, para microscopia de luz na seguinte rotina:

- Desidratação em solução de álcool com concentrações crescentes de 70% até absoluto, ocupando 2 horas cada etapa;
- Clareamento (diafanização) com xilol por 40 minutos;
- Inclusão em parafina entre 2 e 4 horas, na estufa;
- Secção com micrótomo em cortes de 6 μ m;
- Colocação das secções em lâminas;
- Desparafinização;
- Reidratação em soluções de álcool com concentrações decrescentes de soluto até 70%;
- Coloração pelo método hematoxilina-eosina (HE) e
- Montagem com lamínula e Entelan (reagente para fixação de lâmina).

A análise das lâminas foi realizada com fotomicroscópio Zeiss III (Carl Zeiss®).

A documentação fotográfica foi obtida para confirmação das lesões produzidas pelo laser, utilizando-se câmera fotográfica digital de resolução máxima igual a quatro megapixel.

3.7 MÉTODO DA ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para se estimar a PPO do LDI quando sua aplicação aconteceu via transescleral, calculou-se o quociente entre as medidas das áreas ocupadas pelas marcas de fotocoagulação transesclerais e transpupilares.

Baseou-se no princípio de que as áreas ocupadas pelas marcas de fotocoagulação transpupilares corresponderiam ao total da PPO, pois foi considerada desprezível a absorção na córnea, humor aquoso, cristalino e humor vítreo, todos estes meios transparentes à transmissão do LDI. Calculada essa relação, preferiu-se por expressá-la em porcentagem. Assim, um valor de PPO igual a 100% corresponderia, virtualmente, à transmissão total do LDI pela parede ocular.

Para a comparação das áreas fotocoaguladas da retina, as amostras foram consideradas pareadas, já que, para cada animal de experimentação, o OE foi considerado controle e o OD, de estudo.

Inicialmente, analisaram-se todas as variáveis. A análise das áreas fotocoaguladas vias transescleral e transpupilar e o quociente entre estas duas medidas (PPO) foi realizada por meio da observação de valores mínimos e máximos dos quartis, do cálculo de médias e desvios-padrão. Para a representação gráfica dos quartis, mínimo, máximo e valores extremos, foram construídos os diagramas de gráfico de caixas .

Para se estudar o comportamento médio da PPO, conforme a potência aplicada (300 mW, 400 mW e 500 mW) e o tempo (500 ms, 800 ms e 1000 ms) foi utilizado o modelo de Análise de Variância (ANOVA). Em seguida foram realizadas comparações múltiplas “C de Dunnett” para se verificar em quais grupos a PPO apresentou médias distintas.

Medida de Concordância

Com relação à reprodutibilidade da aplicação do laser, atentou-se apenas ao modo transescleral da aplicação do LDI, já que, somente sob esta técnica (FRT), foram respeitados os critérios de correlação clínico-patológico de Tso et al [41].

Consideraram-se, para efeito de cálculo de reprodutibilidade, tão somente esses critérios. Desprezaram-se, portanto, os tamanhos das áreas deixadas pelas marcas de fotocoagulação, que já se apresentavam demasiadamente variáveis, ainda no coelho “piloto”.

Para se estimar a reprodutibilidade clínica da fotocoagulação transescleral, sob cada um dos parâmetros isoladamente, foi calculado o coeficiente kappa a fim de se avaliar a concordância do grau de lesão para classificação em três categorias (1, 2 e 3).

O coeficiente kappa relaciona diferenças entre a proporção de concordância observada (P_o) e a proporção de concordância esperada (P_e) com o denominador ($1 - P_e$), com a hipótese de que não haja concordância com os elementos testados [$k = (P_o - P_e) / (1 - P_e)$].

Em todos os testes estatísticos adotou-se significância de 5%.

4 RESULTADOS

4.1 RETINOGRAFIAS IMEDIATAS

Passados 15 minutos das aplicações do LDI, foram tomadas as retinografias e aferidas as medidas das áreas das marcas retinianas geradas por FRT e FRP, tendo correspondido, esse intervalo de tempo, ao mínimo, suficiente, para que as marcas de fotocoagulação retiniana se tornassem bem discerníveis e regulares.

Este padrão ainda podia ser verificado à oftalmoscopia nas 72 h que seguiram à aplicação do LDI; ocorrendo, a partir de então, leves alterações no formato da marca de fotocoagulação provocada.

No capítulo dos anexos, podem-se observar as tabelas 6 a 14, das medidas das áreas e respectivos graus de lesão, bem como as figuras 19 a 27, das respectivas retinografia ilustrativas, correspondentes aos dados tabulados.

4.2 RETINOGRAFIAS APÓS QUATRO SEMANAS

Passado o período de quatro semanas, as lesões já se apresentavam mal delimitadas, tendo assumido contornos variados, aspecto hiperplásico, e apresentando bordas escurecidas e levemente elevadas em relação à sua área central (figura 7).

Figura 7 - Retinografia ilustrativa do coelho 4, após quatro semanas após aplicação do LDI via transescleral OD (**7a**); retinografia ilustrativa após quatro semanas, após aplicação do LDI via transpupilar OE (**7b**); potência de 800 ms e tempo de 300 mW

Em raras ocasiões, seu centro mostrou-se escurecido, invertendo o padrão encontrado na maioria das marcas de fotocoagulação, devido ao fenômeno de mumificação dos restos celulares (figura 8).

Figura 8 - Retinografia ilustrativa após quatro semanas, coelho 3, com centro das marcas de fotocoagulação via transescleral (OD), ao contrário da maioria destas, apresentando-se escurecido em relação à periferia; potência de 500 ms e tempo de 500 mW

O humor vítreo e a hialóide apresentaram-se transparentes e não houve aparecimento de opacidades cristalinianas, DR, formação de buracos ou roturas em nenhum dos casos estudados, mesmo naqueles olhos submetidos às intensas queimaduras grau 3 durante a aplicação transpupilar.

4.3 MICROSCOPIA DE LUZ

Para fins confirmatórios, foram submetidos os olhos, já enucleados, identificados e fixados numa solução de formaldeído a 10% durante 48h e seccionados na região nasal, à microscopia de luz.

A figura 9, que mostrou corte histológico da retina normal do coelho pigmentado, foi incluída para fins de comparação com as outras áreas retinianas, supostamente alteradas.

Figura 9 - Fotomicrografia do corte histológico de olho de coelho pigmentado no segmento retiniano que não foi submetido ao tratamento com LDI (normal); retina neurosensorial (seta azul); EPR (seta vermelha); o descolamento da retina neurosensorial é artefactual, (50X) HE

4.3.1 Lesões causadas por FRT (grupo de estudo)

As áreas das lesões provocadas pela FRT (grupo de estudo) apresentaram-se semelhantes entre si. Entretanto, a partir das alterações quantitativas e qualitativas de destruição das camadas da retina e coróide e, de acordo com os critérios de correlação clínico-patológicos de Tso et al [41], puderam-se discernir dois subgrupos nestes olhos. No primeiro subgrupo, que corresponde aos coelhos 1, 3, 4 e 6, foram encontradas algumas poucas lesões, cujas alterações histopatológicas encontraram-se, predominantemente, confinadas à camada coriocapilar e do EPR, com pequeno grau de dispersão de pigmentos, irregularmente.

Nessas lesões, apenas os segmentos retinianos externos, dos fotorreceptores, mostraram-se desorganizados e de núcleo picnótico, com necrose do EPR, e formação, ocasional, de trombos que ocluíam a camada coriocapilar, no que foi possível classificá-las com pertencentes ao grau 1 (figura 10).

Figura 10 - Fotomicrografia do corte histológico da retina do coelho 1, tratada por FRT, com perda da arquitetura do EPR e coróide; destruição parcial da camada de fotorreceptores (seta verde); preservação das camadas internas da retina neurosensorial (seta vermelha); potência de 500 ms e tempo de 300 mW; lesão de grau 1, (50X) HE

Entretanto, essas lesões, que no aspecto clínico pareciam mais leves, não confirmaram tal aparência ao exame histopatológico. Na maior parte das lesões encontradas nesse subgrupo, houve dano tecidual mais extenso, envolvendo as camadas do EPR, coriocapilar, fotorreceptores, nuclear externa e plexiforme externa, com maior dispersão de grânulos pigmentados. As camadas mais externas da retina, mais especificamente,

EPR, membrana limitante externa e camada coriocalilar foram necrosadas, no que se pôde classificá-las como pertencentes ao grau 2 (figura 11).

Figura 11 - Fotomicrografia do corte histológico da retina do coelho 4, tratada por FRT, com acometimento do EPR e coróide e perda da arquitetura das camadas externas da retina neurosensorial (seta azul); potência de 800 ms e tempo de 300 mW; lesão de grau 2, (50X) HE

No segundo subgrupo, que incluiu os coelhos 2, 5, 7, 8 e 9, algumas das lesões encontradas mostraram dano tecidual envolvendo as camadas coriocalilar, EPR, fotorreceptores e seus processos externos e camada nuclear externa, com forte dispersão de pigmentos por todas as camadas da retina.

As fotomicrografias da retina apresentaram-na com formato de “escalope” no segmento tratado. Nesses cortes histológicos, muitas vezes, não apenas os segmentos externos dos fotorreceptores mostraram-se desorganizados, mas a porção interna da retina apresentou-se levemente edemaciada, às vezes com desorganização parcial das células

ganglionares, no que se pôde classificá-los como pertencentes ao grau 2 (figura 12).

Figura 12 - Fotomicrografia do corte histológico da retina do coelho 2, tratada por FRT, mostrando perda da arquitetura das camadas externas da retina, ausência de EPR e fotorreceptores, mas razoável preservação das camadas internas; formato típico de "escalope" no segmento tratado (seta verde); potência de 500 ms e tempo de 400 mW; lesão de grau 2, (50X) HE

Na periferia dessas lesões observou-se a presença de vacúolos nas células do EPR, e na camada nuclear externa da retina afetada. Os fotorreceptores mostraram-se necrosados, tão como a camada coriocapilar, com presença maciça de trombos (figura 13). O restante das camadas mais internas da retina apresentou-se poupado da necrose tecidual.

Figura 13 - Fotomicrografia do corte histológico da retina do coelho 5, tratada por FRT; presença maciça de trombos na camada coriocalilar e da coróide nas áreas adjacentes ao segmento tratado (seta verde); potência de 800 ms e tempo de 400 mW, (80X) HE

No entanto, tais lesões, que no aspecto clínico pareciam moderadas, não confirmaram tal aspecto ao exame histopatológico. A maior parte das lesões encontradas nesse subgrupo caracterizou-se, microscopicamente, por dano histopatológico irreversível, tanto nas camadas coriocalilar, EPR, de fotorreceptores, nuclear externa e plexiforme externa, todas estas pertencentes à retina externa, quanto nas camadas internas da retina, incluindo a nuclear interna e plexiforme interna e as camadas de células ganglionares e de fibras nervosas, no que se pôde classificá-las como pertencentes ao grau 3.

As células dos núcleos das camadas ganglionar e de fibras nervosas encontraram-se picnóticas e, por vezes, com presença de vacúolos intracelulares. Nas circunstâncias, detectou-se a presença de macrófagos contendo pigmento melânico e invasão de células do EPR (figura 14).

Figura 14 - Fotomicrografia do corte histológico da retina do coelho 9, tratada por FRT, mostrando perda da arquitetura da retina neurossensorial e ausência do EPR e fotorreceptores; além da presença de macrófagos contendo pigmento melânico (seta azul); presença de vacuolização celular (seta verde); potência de 800 ms e tempo de 500 mW; lesão de grau 3, (50X) HE

4.3.2 Lesões causadas por FRP (grupo controle)

Em todos os coelhos, as lesões geradas por FRP (grupo controle), sem objetivos clínicos, caracterizaram-se, na maior parte dos cortes da retina, por compactação e atrofia de todo o segmento retiniano tratado, desde o EPR e camada coriocalilar até as camadas ganglionar e nuclear e plexiforme internas.

Em alguns segmentos tratados, não ocorreu compactação, mas não houve preservação da arquitetura da retina, com desorganização e acentuada dispersão de pigmentos por todas as camadas da retina; nestes raros segmentos, as lesões corresponderam ao grau 3 (figura 15).

Figura 15 - Fotomicrografia do corte histológico da retina do coelho 7, tratada por FRP, mostrando perda total da arquitetura da retina; acentuada dispersão de grânulos pigmentados por toda espessura retiniana (seta azul); potência de 1000 ms e tempo de 300 mW; lesão de grau 3, (50X) HE

Na maior parte dos segmentos tratados por FRP, a camada coriocapilar apresentou-se, freqüentemente, necrosada e, por vezes, ocluída por trombos. Muitas vezes, compactou-se à retina neurosensorial e ao EPR de tal forma, que todos estes segmentos foram reduzidos a um único folheto, atrófico e necrótico, constituído por células metaplásicas do EPR e células gliais (figura 16).

Figura 16 - Fotomicrografia do corte histológico da retina do coelho 8, tratada por FRP; atrofia total da retina a um único folheto (seta verde); DR neurossensorial é artefactual; potência de 1000 ms e tempo de 400 mW; ausência de grau terapêutico na lesão, (50X) HE

Com relação ao corpo vítreo, foi freqüentemente observado, tanto no grupo de coelhos submetidos à FRT (estudo), quanto naquele submetido à FRP (controle), que a hialóide posterior, muitas vezes, apresentava-se aderente à membrana limitante interna das cicatrizes das lesões provocadas pelo laser (figura 17).

Figura 17 - Fotomicrografia do corte histológico da retina do coelho 7, tratado por FRT; aderência da hialóide posterior à retina no local da cicatriz causada pela fotocoagulação (seta verde); DVP ao redor da lesão (seta azul), (50X) HE

Muitas vezes, também se observou DR neurosensorial nas fotomicrografias obtidas. O processo ocorreu durante a fixação e corte dos olhos para posterior preparação das lâminas. Dessa maneira, ocorreu separação artefactual da retina e do EPR (figura 18).

Figura 18 - Fotomicrografia do corte histológico da retina do coelho 6, tratada por FRT; separação artefactual da retina após preparação das lâminas para estudo. Retina descolada (seta azul); retina adjacente aderida (seta verde); potência de 800 ms e tempo de 500 mW, (50X) HE

4.4 ANÁLISE DESCRITIVA DOS DADOS

Por meio da Tabela 1, observa-se que, independentemente dos tempos de aplicação, a média da PPO tendeu a diminuir com o aumento da potência. Este padrão também pode ser observado por meio do gráfico de intervalo de confiança de 95% para a média (gráfico 1).

Tabela 1 – Medidas e resumo da PPO (%) por tempo e potência

Tempo (ms)	Potência (mW)	Média	Erro padrão	Desvio padrão	Mínimo	Máximo	Percentis		
							25	50	75
500									
N=30	300	62,98	1,21	6,64	51,41	78,04	57,38	63,64	67,37
N=30	400	60,32	1,32	7,23	47,17	73,67	54,73	59,49	66,10
N=30	500	58,95	1,14	6,26	44,17	71,58	55,08	59,14	62,83
800									
N=30	300	62,56	1,86	10,20	44,09	84,97	54,90	62,61	67,06
N=30	400	61,50	1,63	8,95	48,71	89,59	55,21	62,13	66,64
N=30	500	59,26	1,04	5,72	48,18	73,17	54,50	59,41	62,73
1000									
N=30	300	63,87	0,85	4,65	54,44	75,68	60,75	63,95	66,25
N=30	400	61,44	0,93	5,12	49,27	70,00	58,55	62,14	64,76
N=30	500	59,73	1,07	5,86	50,75	77,34	55,44	58,62	62,38

Gráfico 1 – Gráfico de Intervalo de Confiança de 95% para as médias de PPO

De acordo com o gráfico 2, nota-se a presença de alguns valores de PPO destoantes.

Gráfico 2 – Gráfico de caixas da PPO (%) por tempo e potência

4.5 COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DAS PPO POR POTÊNCIA E TEMPO

Inicialmente foi realizada Análise de Variância com dois fatores fixos (tempo e potência), não tendo sido detectado efeito de interação entre eles ($p\text{-value} = 0,9754$), de acordo com a tabela 2. A ausência de interação entre a potência e o tempo implicou que o comportamento da PPO por potência não dependera do tempo de aplicação, conforme pode ser observado por meio do gráfico 3. Não houve evidências do efeito de tempo de aplicação sobre a PPO ($p\text{-value} = 0,6619$), somente da potência ($p\text{-value} = 0,0013$). Como visto descritivamente, a média da PPO tendera a diminuir com o aumento da potência, sob qualquer parâmetro de tempo de aplicação, o que pode ser observado nas médias das PPO corrigidas, e respectivos desvios padrão, por meio da tabela 3.

Tabela 2 – Análise de Variância para comparação de médias

Fonte de Variação	Soma de Quadrado	Graus de liberdade	Quadrado Médio	Estatística F	p-value
potência	658,78	2	329,39	6,82	0,0013
tempo	39,90	2	19,95	0,41	0,6619
potência * tempo	23,10	4	5,77	0,12	0,9754
Resíduo	12.600,93	261	48,28		
TOTAL	13.322,72	269			

Teste de Levene para Igualdade de Variâncias ($F = 2,996$; gl numerador = 8, gl denominador = 261, $p = 0,003$)

Gráfico 3 – Estimativa da Média Marginal da PPO (%) **Tabela 3** - Média e Desvio padrão para PPO (%) por potência segundo os tempos de aplicação

Potência (mW)	Tempo (ms)	Média	Desvio Padrão	N
300	500	62,98	6,64	30
	800	62,56	10,20	30
	1000	63,87	4,65	30
	Total	63,14	7,46	90
400	500	60,32	7,23	30
	800	61,50	8,95	30
	1000	61,44	5,12	30
	Total	60,91	8,09	90
500	500	58,95	6,26	30
	800	59,26	5,72	30
	1000	59,73	5,86	30
	Total	59,11	5,94	90
Total	500	60,75	6,85	90
	800	61,11	8,52	90
	1000	61,68	5,45	90
	Total	61,18	7,04	270

Como foram detectados somente os efeitos da potência no teste de análise de variância, foram utilizadas comparações múltiplas C de Dunnett para se verificar em quais potências a PPO apresentou médias distintas.

De acordo com a Tabela 4, não foram detectadas diferenças entre as médias associadas às potências 500 mW e 400 mW, com significância de 5% (Subgrupo 1). Da mesma forma, não foram detectadas diferenças entre as médias associadas às potências 400 mW e 300 mW (Subgrupo 2). Porém verificou-se que a média de PPO a 300 mW foi significativamente superior à de 500 mW (subgrupo 3).

Tabela 4 - Comparação múltipla de C de Dunnett

Potência (I)	Potência (J)	Diferença entre as médias (I-J)	Erro Padrão	Intervalo de Confiança de 95% para a diferença	
				Limite Inferior	Limite Superior
300 mW	400 mW	2,05	1,09	-0,56	4,66
400 mW	500 mW	1,77	0,98	-0,57	4,11
500 mW	300 mW	-3,82*	1,00	-6,21	-1,43

* Diferença com significância de 5%

4.6 ANÁLISE DA REPRODUTIBILIDADE

Apreciadas suas marcas, analisaram-se as características das 30 fotocoagulações, de modo que as 15 primeiras foram pareadas com as restantes, pois, sob o aspecto anatômico e topográfico, puderam-se considerá-las como pertencentes a regiões idênticas.

Houve total discordância ao se compararem as áreas ocupadas pelas marcas de fotocoagulação pareadas. Embora menor, também houve discordância ao se compararem, clinicamente, as marcas de fotocoagulação pareadas. Entretanto, ao invés de se ter “penalizado” completamente, sempre que houve discordância, “penalizou-se” parcialmente de acordo com as equivalências adotadas. Assim, foi calculado o Kappa ponderado, apresentado na Tabela 5, utilizando-se pesos de 0,95.

Portanto, apesar de terem sido encontrados valores muito baixos de Kappa, caso fosse levada em consideração a mensuração matemática das marcas de fotocoagulação, constatou-se excelente reprodutibilidade, ao se ter considerado o espectro aceitável na prática clínica (graus 1, 2 e 3), com variação máxima de um grau, para mais ou para menos, dentro do critério clínico adotado.

Tabela 5 - Distribuição dos graus de lesão transescleral: 1ª medida e 2ª medida com equivalência parcial de lesões

Tempo (ms)	Potência (mW)	Grau da Lesão – 1ª medida	Grau de Lesão – 2ª medida						Total		Kappa	EP	t	p-value
			1		2		3							
			N	Linha (%)	N	Linha (%)	N	Linha (%)	N	Linha (%)				
500	300	1	13	100,0	0	0,0			13	100,0	1,000	0,000	3,873	< 0,0001
		2	0	0,0	2	100,0			2	100,0				
		Total	13	86,7	2	13,3			15	100,0				
500	400	2			1	100,0	0	0,0	1	100,0	1,000	0,000	3,873	< 0,0001
		3			0	0,0	14	100,0	14	100,0				
		Total			1	6,7	14	93,3	15	100,0				
500	500	1	14	100,0	0	0,0			14	100,0	1,000	0,000	3,873	< 0,0001
		2	0	0,0	1	100,0			1	100,0				
		Total	14	93,3	1	6,7			15	100,0				
800	300	1	13	100,0	0	0,0			13	100,0	1,000	0,000	3,873	< 0,0001
		2	0	0,0	2	100,0			2	100,0				
		Total	13	86,7	2	13,3			15	100,0				
800	400	1	1	100,0	0	0,0			1	100,0	1,000	0,000	3,873	< 0,0001
		2	0	0,0	14	100,0			14	100,0				
		Total	1	6,7	14	93,3			15	100,0				
800	500	1	14	100,0	0	0,0			14	100,0	1,000	0,000	3,873	< 0,0001
		2	0	0,0	1	100,0			1	100,0				
		Total	14	93,3	1	6,7			15	100,0				
1000	300	2			2	100,0	0	0,0	2	100,0	1,000	0,000	3,873	< 0,0001
		3			0	0,0	13	100,0	13	100,0				
		Total			2	13,3	13	86,7	15	100,0				
1000	400	2			3	100,0	0	0,0	3	100,0	1,000	0,000	3,873	< 0,0001
		3			0	0,0	12	100,0	12	100,0				
		Total			3	20,0	12	80,0	15	100,0				
1000	500	1	1	100,0	0	0,0			1	100,0	1,000	0,000	3,873	< 0,0001
		2	0	0,0	14	100,0			14	100,0				
		Total	1	6,7	14	93,3			15	100,0				

5 DISCUSSÃO

Algumas considerações devem ser feitas no que diz respeito ao olho do coelho. Apesar de haver características peculiares neste, tais como o posicionamento da “ora serrata” a apenas 3 mm do limbo, praticamente ausência da “pars plana” e tamanho desproporcionalmente maior do cristalino em relação ao total do bulbo ocular, é sabido que sua retina compartilha de anatomia muito semelhante à do ser humano [35].

Tem sido constatado que, geralmente, maior potência precisa ser empregada nas aplicações do laser a fim de produzir queimaduras na retina humana, em comparação com o coelho, mas a relação dose-resposta, neste último, já está bem comprovada [35, 42]. Além disso, a região ocular, deliberadamente trabalhada, neste estudo, não sofre interferência de musculatura ocular extrínseca, o que poderia, eventualmente, alterar a espessura e a composição da parede ocular e, conseqüentemente, os valores de PPO e de estadiamento clínico aferidos [43].

No quesito espessura escleral, o animal cuja característica mais se aproxima à do ser humano é o porco [44]. Porém, devido a dispersão irregular de sua composição de fibrilas de colágeno, a esclera porcina apresenta menor transmitância à luz quando comparada à esclera cunicular, mais próxima à esclera humana. Afora isso, a esclera porcina, diferentemente da cunicular e da humana, contém inúmeros grânulos de melanina dispersos, fato que poderia heterogeneizar o padrão de absorção do LDI [39]. A retina dos primatas também foi aventada como possibilidade

para este estudo, mas devido às características de absorvância de sua retina e coróide ao LDI, consideravelmente maiores que nas outras espécies, incluindo a humana e a cunicular, a opção foi prontamente descartada [45].

Muito embora a esclera cunicular apresente espessura de 0,2 mm na região ocular por nós estudada, inferior à do ser humano adulto, que é próxima a 0,4 mm no equador do olho, sabe-se que nela, o LDI tem fator de transmitância 1,8 vezes maior que na esclera humana [46-48]. A simples existência do “fator de transmitância” corrobora, por si só, na viabilidade de se tentar aferir, experimentalmente, a PPO, por se tratar de aferição bem sucedida daquele fator, também em condições experimentais.

Até então, poucos estudos almejaram medir a reprodutibilidade da fotocoagulação retinianas via transescleral. Boa parte destes se baseia no fato de que o olho humano apresenta excessiva variabilidade de pigmentação, tanto entre os olhos de um mesmo indivíduo, quanto entre diferentes regiões de um mesmo olho [40, 41, 49]. Mesmo a retina cunicular, embora mais homogênea em pigmentação, também apresenta pequenas variações [49, 50]. Entretanto, a reprodutibilidade, aqui apresentada, não se focou em números matemáticos, mas em caracterização clínica pois, também neste estudo, foi encontrada variabilidade nas mensurações de área retiniana fotocoagulada. Mesmo assim, procurou-se trabalhar na periferia da retina cunicular, que é relativamente avascular e bastante homogênea, como já dito, quando comparada à retina humana [51, 52].

Levou-se em conta, com a mesma cautela, a questão da indentação provocada pela ponta da sonda transescleral. Foi considerado que, para produzir marcar de FRT, a indentação referida deveria ser a mínima suficiente para permitir visão indireta do laser “guia” daquela sonda, por transiluminação pois, como constatado na literatura consultada, a indentação excessiva resulta em compactação do colágeno escleral, da coróide e do sangue nela circulante, acentuando exageradamente a passagem do LDI via transescleral [53]. Foi respeitada, por esta razão, a indentação já proporcionada pela protusão poligonal da ponta da sonda de diopexia.

No cálculo de reprodutibilidade, foram penalizadas parcialmente as discordâncias, de acordo com as equivalências adotadas. Landis e Kock classificam os valores de kappa para graus de concordância maiores que 0,75 representando excelente concordância, valores entre 0,40 e 0,75, resultando bom e menores que 0,40, concordância pobre. Ora, se o instrumento mediu categorias ordenadas, como grau de lesão leve, moderado e grave, o kappa ponderado pôde fornecer uma estimativa adequada do coeficiente de confiabilidade [54, 55].

As marcas de fotocoagulação potencialmente perigosas à estrutura da retina após a aplicação do LDI são aquelas que ultrapassam o grau máximo (grau 3) do critério clínico proposto por Tso et al [41]. Tais marcas poderiam causar dano irreversível à membrana de Bruch, ao rompê-la e, conseqüentemente, abrir possibilidade para surgimento de roturas e

buracos da retina ou, ainda, neovascularização sub-retiniana, esta última devido à quebra da barreira hematorretiniana [35, 53].

Teoricamente, a lesão grau 1 proporciona hiperplasia do EPR, a lesão grau 2, hiperplasia do EPR, regressão de neovasos e leve aderência coriorretiniana e a lesão grau 3, forte aderência coriorretiniana, além das outras características anteriormente citadas, todas adequadas à fotocoagulação retiniana. Marcas mais acentuadas, que ultrapassam o grau 3, provocam enrugamento da lesão e destruição concomitante de todas as camadas da retina, às vezes acompanhadas por hemorragia da coróide, e são consideradas excessivas e inadequadas do ponto de vista terapêutico [41].

Ao considerar-se aceitável a variação, eventual, de, somente, um grau, ao se tentar reproduzir uma lesão, sempre dentro dos limites clínicos estabelecidos, conferir-se-ia segurança e confiabilidade ao procedimento. [40, 41]. Assim, foi possível detectar reprodutibilidade clínica dentro dos critérios de correlação clínico-patológicas de Tso et al [41], pois tal classificação é bem firmada, amplamente aceita e citada por diversos estudos à respeito da ação do LDI [26, 40, 42, 53, 56].

Um fenômeno peculiar foi observado durante a aplicação do LDI na retina, tanto na forma de FRT quanto FRP. Houve latência de 10 a 15 minutos entre a fotocoagulação e o surgimento de marcas discerníveis à oftalmoscopia. O fato parece ter ocorrido devido à profundidade do alcance proporcionado pelo comprimento de onda infravermelho do LDI, quando comparado aos lasers de argônio ou criptônio [18, 26, 40]. Um dos estudos

consultados adverte expressamente para não se tentar produzir marcas de fotocoagulação tão nítidas quanto aquelas geradas pelo laser de argônio, sob o risco de se causar hemorragia da coróide [5].

Teoricamente, ao contrário do que acontece com os outros lasers de espectro visível, cujo comprimento de onda é absorvido pelos cromóforos da retina interna, a queimadura se iniciaria das camadas mais externas da retina, onde são melhor absorvidas. Este fenômeno também foi notificado em outros estudos que fizeram uso do LDI [29, 40, 57, 58].

Igualmente, foi observado que as queimaduras provocadas pela FRT apresentaram melhor definição das bordas quando comparadas àquelas provocadas FRP, o que está coerentes com o que foi encontrado na bibliografia pesquisada [15, 26, 59]. Possivelmente, este fato foi devido à absorção da energia na esclera e nos pigmentos da coróide, mais saturados no coelho que no ser humano, o que também corroborou para explicar a queda da PPO em potências mais elevadas; os pigmentos da coróide funcionariam, ao menos teoricamente, como “barreira” à passagem do LDI em direção à retina [40].

Clinicamente, foi possível correlacionar inversamente a potência aplicada com a PPO nos parâmetros empregados durante as sessões de FRT. É importante enfatizar, todavia, que isto implica apenas no aumento, e provável agravamento histopatológico da lesão gerada, via transpupilar, de maneira desproporcional àquele constatado quando ocorre a aplicação do LDI via transescleral. O mesmo não foi detectado em relação ao tempo da exposição ao laser, pois houve pouca ou nenhuma diferença

clínica entre as marcas de fotocoagulação produzidas após aplicações de 500, 800 ou 1000 ms. A situação deparada encontra suporte em outros estudos, que concluíram ser menor a atuação do fator tempo na FRT, o que torna, portanto, mais segura a alteração deste parâmetro, para mais ou para menos, durante o procedimento [40, 42, 60].

O exame histopatológico, procurou enfocar-se, como explicitado em todo estudo, à técnica de FRT, porque foram, exclusivamente para esta técnica, otimizados os parâmetros do LDI utilizados no presente estudo, quando foi tratado e observado, clinicamente, o coelho “piloto”, sob limites de potência e tempo próximos daqueles utilizados em estudos previamente publicados [15, 33, 35, 40, 46, 51, 60]. Ou seja, parâmetros estes, que se mostraram demasiadamente agressivos, quando utilizados na técnica de FRP.

Por razões anteriormente comentadas, considerou-se a classificação de correlação clínico-patológica elaborada pelo estudo original de Tso et al, o “padrão ouro” das aferições clínicas deste estudo [41]. Entretanto, neste estudo, diferentemente daquele e da maioria dos trabalhos relativos ao tema, que consideraram lesões agudas, de até 15 dias, período suficiente para surgirem os primeiros sinais de cicatrização e pigmentação retiniana, procuraram-se estabelecer resultados que mostrassem lesões crônicas, à médio e longo prazo [5, 33, 42, 46, 58, 61].

A exemplo de outros estudos da literatura especializada, para as alterações histopatológicas aqui encontradas, não foi possível elaborar cálculo estatisticamente aceitável; as lesões produzidas pelo LDI, tanto na

FRP quanto na FRT, mostraram-se extremamente difíceis de serem discernidas de maneira individualizada, à microscopia óptica, ainda que sob técnicas de marcação apropriadas [5, 15, 33, 46, 60, 61].

À microscopia de luz, as retinas submetidas à FRT dos coelhos 1, 3, 4 e 6 (primeiro de dois subgrupos) apresentaram algumas raras lesões que estão em conformidade com o grau 1 do critério utilizado; a maior parte destas lesões apresentava características relativas ao grau 2, ou seja, o EPR, as camadas da retina neurosensorial externa e parte da interna mostraram-se alteradas. Entretanto, as lesões apreciadas à microscopia foram consequência de FRT que, com exceção do coelho 5, provocou marcas com classificação grau 1.

Nos coelhos 2, 5, 7, 8 e 9, algumas lesões encontradas puderam ser classificadas como pertencentes ao grau 2, entretanto, a exemplo do primeiro subgrupo de coelhos, as lesões encontradas, em sua maioria, também pertenciam a um grau acima de sua aparência clínica original, ou seja, ao grau 3. A retina neurosensorial externa e interna mostrou-se bastante alterada neste subgrupo.

O fato parece estar relacionado ao tempo de espera, portanto à cronicidade das lesões. A literatura consultada confirma que tais lesões vão sofrendo modificações histopatológicas irreversíveis após a primeira semana e logo se tornam irreconhecíveis, quando comparadas à sua fase aguda, geralmente com numerosas lesões inespecíficas [5, 58].

No aspecto histológico, ocorreu, além do edema celular, que foi se espalhando da retina externa para a interna, maior e mais acentuada dispersão de pigmentos, inclusive em direção corpo vítreo, como observado em outro estudo, cujo exame microscópico foi realizado após três semanas da FRT [35]. Em poucas semanas, a arquitetura da retina fotocoagulada, que a princípio, encontrava-se levemente desorganizada, foi desaparecendo por completo, como observado em outra pesquisa de médio prazo, com exame histopatológico de três meses da FRT [15, 60].

Foi encontrado na literatura consultada, inclusive, estudo que sugere não haver, mesmo durante a fase aguda, a tão almejada seletividade do LDI para com as camadas mais profundas e externas da retina neurosensorial, o que, ao menos em teoria, pouparia a retina interna e, por consequência, traria melhorias à visão dos pacientes que passaram por extensos procedimentos de FRP [26]. As lesões seriam muito semelhantes, a médio e longo prazo, àquelas causadas por outros tipos de laser, especialmente o de criptônio [12, 13, 19, 62, 63].

Por outro lado, para alguns autores, a FRT parece promissora a aqueles pacientes que necessitam ablação periférica da retina, especialmente os portadores de "rubeosis iridis", retinopatia da prematuridade com presença de túnica vascularizada, e de retinopatia diabética, que, por sua suscetibilidade à neovascularização, necessitam constantes complementações de FRP, ou mesmo para a cirurgia de vitrectomia que, devido à opacidade dos meios ou mesmo à limitação da visão da ponta da

sonda de endolaser, por parte do cirurgião, não foram passíveis de tratamento pelo LDI [64-67].

Nas retinas daqueles coelhos submetidos às graves lesões da FRP, foram observados compactação e afilamento da retina tratada; durante os procedimentos de FRP foi possível, muitas vezes, ser notado o sinal de “estalido” audível associado, segundo a literatura pesquisada, à indesejável ruptura da membrana de Bruch, causadora de membrana neovascular sub-retiniana e à formação “explosiva” de buracos na retina, por lesão direta nesta última, dentre outras situações iatrogênicas detectadas em estudos que empregaram parâmetros semelhantes [5, 67]. Como dito, nesses casos não foram respeitados quaisquer parâmetros de segurança.

Neste estudo, a exemplo de outros, não houve preocupação com grande número de coelhos. O tamanho da amostra não correspondeu ao número de unidades biológicas, mas ao de fotocoagulações provocadas nas suas retinas ($n = 270$). Assim, foi utilizada a quantidade de animais de experimentação estritamente necessária para que se conseguisse cálculo estatístico aceitável [15, 18, 26, 35, 53, 61].

É importante reconhecer que as aferições das áreas de acometimento pelo LDI, deste estudo, corresponderam a estimativas aproximadas, já que os aparelhos empregados, ainda que calibrados, foram projetados para uso no olho humano [68]. Entretanto, vale salientar que nosso enfoque priorizou a PPO, ou seja, o quociente formado entre aquelas medidas, que não é afetado por esses fatores.

Também não foi objetivo deste estudo constatar as propriedades físicas do LDI na esclera. Baseadas nas teorias de Beer e Kubelka-Munk, tentativas experimentais de mensurar as características físicas espectrais, de transmitância, absorvância e reflexão óptica do LDI na esclera, com auxílio de espectrofotômetro, têm sido realizadas em diversos estudos [39, 45, 48, 52]. Entretanto, cabe lembrar que nenhum destes pôde ser realizado *in vivo*; desta forma, o presente estudo procurou ater-se, ao máximo, às características clinicamente detectáveis da PPO, logo após a aplicação do LDI via transescleral.

Considerações finais

Para continuidade dessa linha de estudo, seria interessante pesquisar a possibilidade de se aumentar a PPO com uso parenteral do corante indocianina verde, cuja absorção específica ao espectro infravermelho facilitaria a atuação do LDI via transescleral, sem que houvesse a necessidade do uso de parâmetros exageradamente elevados de tempo e potência, o que já é tendência no uso transpupilar deste laser [49, 69]. Sua aplicação prática poderia ser encontrada no tratamento transescleral das membrana neovasculares, já que o referido contraste tende a se confinar nos vasos da coróide e o LDI, teoricamente, pouparia as

estruturas da retina, uma vez seu trajeto partiria da esclera e se encerraria no tecido alvo.

A utilização de modelos experimentais de edema retiniano, simulando fases avançadas de doenças como retinopatia diabética e oclusão de veia central da retina, dentre outras condições clínicas, cuja aplicação do LDI via transescleral seria ideal, também poderia ser aventada em futuros estudos.

Igualmente, desta vez, *in anima nobile*, seria valioso estudar a evolução clínica, comparativa, de grupos de pacientes portadores de retinopatia diabética, previamente submetidos à cirurgia de vitrectomia acompanhada, ou não, de ablação da retina periférica com uso do LDI via transescleral, já que este parece ser o método mais simples e seguro de se atingir a periferia da retina sem danificar as estruturas adjacentes.

6 CONCLUSÕES

Pode-se concluir que, para os parâmetros utilizados nesta pesquisa:

1. Foi detectada relação inversa dose-resposta em relação à PPO durante a FRT.
2. Foi possível estimar a PPO, durante a aplicação do laser transescleral, cuja taxa variou entre 58,95 a 63,87%.
3. A média da PPO a 300 mW (63,14%) apresentou-se superior à de 500 mW (59,11%), com significância de 5%.
4. O uso do LDI mostrou-se reprodutível no modelo experimental, enquanto aplicado via transescleral.
5. O uso do LDI, via transescleral, também mostrou-se seguro. Sua absorção variou dentro de faixas apropriadas e previsíveis em nosso modelo de estudo.

Tabela 6 - Medidas das áreas fotocoaguladas, após 15 minutos da aplicação do LDI no coelho 1, conforme potência e tempo utilizados e grau clínico da marca de FRT

Tempo (ms)	Potência (mW)	Área transescleral (OD) (mm ²)	Grau da lesão	Área transpupilar (OE) (mm ²)
500	300	0,677	1	1,103
		0,591	1	0,904
		0,718	1	1,249
		0,611	1	0,890
		0,657	1	1,187
		0,612	1	0,932
		0,640	1	0,956
		0,621	1	0,869
		0,707	1	0,994
		0,732	2	1,041
		0,746	2	1,211
		0,585	1	1,138
		0,590	1	1,102
		0,742	1	1,109
		0,664	1	0,929
		0,703	1	1,165
		0,721	1	1,106
		0,580	1	1,084
		0,557	1	1,015
		0,654	1	1,058
		0,645	1	1,003
		0,595	1	0,945
		0,599	1	1,105
		0,625	1	1,068
		0,698	1	0,988
		0,642	1	1,125
		0,645	1	1,105
		0,703	1	1,079
		0,703	1	1,069
		0,782	2	1,002

Figura 19 - Retinografia do coelho 1, marcas de fotocoagulação após 15 minutos da aplicação do LDI via transescleral OD (19a) e transpupilar OE (19b); tempo de 500 ms e potência de 300 mW

Tabela 7 - Medidas das áreas fotocoaguladas, após 15 minutos da aplicação do LDI no coelho 2, conforme potência e tempo utilizados e grau clínico da marca de FRT

Tempo (ms)	Potência (mW)	Área transescleral (OD) (mm ²)	Grau da lesão	Área transpupilar (OE) (mm ²)
500	400	1,382	1	2,643
		1,867	3	2,756
		1,684	2	3,028
		1,572	2	2,675
		1,654	2	3,002
		1,667	2	2,933
		1,454	2	2,466
		1,819	2	2,469
		1,407	2	2,983
		1,289	2	2,472
		1,643	2	2,359
		1,639	2	2,346
		1,714	2	2,451
		1,728	2	2,821
		1,587	2	2,490
		1,626	2	2,503
		1,640	2	2,325
		1,677	2	2,589
		1,543	2	2,594
		1,703	2	2,864
		1,443	1	2,632
		1,399	1	2,691
		1,701	2	2,623
		1,358	1	2,693
		1,728	2	2,636
		1,519	2	2,789
		1,692	2	2,838
		1,842	2	2,708
		1,628	2	2,736
		1,387	2	2,864

Figura 20 - Retinografia do coelho 2, marcas de fotocoagulação após 15 minutos da aplicação do LDI via transescleral OD (20a) e transpupilar OE (20b); tempo de 500 ms e potência de 400 mW

Tabela 8 - Medidas das áreas fotocoaguladas, após 15 minutos da aplicação do LDI no coelho 3, conforme potência e tempo utilizados e grau clínico da marca de FRT

Tempo (ms)	Potência (mW)	Área transescleral (OD) (mm ²)	Grau da lesão	Área transpupilar (OE) (mm ²)
500	500	1,167	1	2,006
		1,218	1	1,951
		0,955	1	2,162
		1,248	1	2,044
		1,280	1	2,208
		1,222	1	1,900
		1,150	1	2,096
		1,142	1	2,085
		1,075	1	1,926
		1,007	1	2,000
		1,321	2	1,878
		1,264	1	2,134
		1,227	1	2,225
		1,118	1	2,315
		1,233	1	2,190
		1,339	1	2,059
		1,302	1	2,284
		1,165	1	2,196
		1,307	1	2,041
		1,113	1	1,861
		1,160	1	1,898
		1,123	1	2,232
		1,378	2	2,263
		1,254	1	1,830
		1,239	1	1,731
		1,227	1	1,981
		1,185	1	2,007
		1,208	1	2,084
		1,309	2	2,004
		1,252	1	2,102

Figura 21 - Retinografia do coelho 3, marcas de fotocoagulação após 15 minutos da aplicação do LDI via transescleral OD (21a) e transpupilar OE (21b); tempo de 500 ms e potência de 500 mW

Tabela 9 - Medidas das áreas fotocoaguladas, após 15 minutos da aplicação do LDI no coelho 4, conforme potência e tempo utilizados e grau clínico da marca de FRT

Tempo (ms)	Potência (mW)	Área transescleral (OD) (mm ²)	Grau da lesão	Área transpupilar (OE) (mm ²)
800	300	1,111	1	2,093
		0,925	1	1,998
		1,070	1	1,709
		1,142	1	2,249
		1,015	1	2,302
		1,148	1	2,068
		1,161	1	1,931
		1,428	2	1,879
		1,222	1	2,062
		1,263	1	1,935
		1,606	1	1,950
		1,459	2	1,717
		1,296	1	2,108
		1,273	1	1,903
		1,238	1	1,826
		1,124	1	1,795
		1,209	1	1,861
		1,276	1	2,043
		1,116	1	1,908
		1,289	1	1,967
		0,978	1	1,901
		1,239	1	1,855
		0,924	1	2,031
		1,486	2	1,899
		1,274	1	2,011
		1,302	1	1,749
		1,262	1	2,054
		1,185	1	1,826
		1,102	1	2,103
		1,259	1	1,864

Figura 22 - Retinografia do coelho 4, marcas de fotocoagulação após 15 minutos da aplicação do LDI via transescleral OD (22a) e transpupilar OE (22b); tempo de 800 ms e potência de 300 mW

Tabela 10 - Medidas das áreas fotocoaguladas, após 15 minutos da aplicação do LDI no coelho 5, conforme potência e tempo utilizados e grau clínico da marca de FRT

Tempo (ms)	Potência (mW)	Área transescleral (OD) (mm ²)	Grau da lesão	Área transpupilar (OE) (mm ²)
800	400	1,065	2	1,773
		0,967	1	1,955
		1,058	2	2,172
		1,133	2	1,747
		1,110	2	1,896
		1,230	2	1,719
		1,471	2	1,642
		1,361	2	2,151
		1,199	2	1,651
		1,078	2	2,139
		1,143	2	2,021
		0,998	2	1,940
		1,383	2	2,041
		1,176	2	1,824
		1,145	2	2,041
		1,028	2	1,969
		1,198	2	1,616
		1,387	2	2,090
		1,304	2	2,083
		1,112	2	1,785
		1,215	1	2,087
		0,976	1	1,975
		1,249	2	1,851
		1,227	2	1,948
		1,161	2	1,856
		1,327	2	1,891
		1,125	2	2,008
		1,263	2	2,038
		1,108	2	2,100
		1,227	2	2,034

Figura 23 - Retinografia do coelho 5, marcas de fotocoagulação após 15 minutos da aplicação do LDI via transescleral OD (23a) e transpupilar OE (23b); tempo de 800 ms e potência de 400 mW

Tabela 11 - Medidas das áreas fotocoaguladas, após 15 minutos da aplicação do LDI no coelho 6, conforme potência e tempo utilizados e grau clínico da marca de FRT

Tempo (ms)	Potência (mW)	Área transescleral (OD) (mm ²)	Grau da lesão	Área transpupilar (OE) (mm ²)
800	500	1,561	1	2,564
		1,268	1	2,632
		1,199	1	2,295
		1,441	1	2,354
		1,338	1	1,856
		1,348	1	2,044
		1,328	1	2,487
		1,361	1	2,370
		1,378	1	2,588
		1,497	1	2,458
		1,343	1	2,157
		1,432	1	2,368
		1,219	1	2,207
		1,543	2	2,406
		1,310	1	2,289
		1,462	2	2,246
		1,358	2	2,531
		1,337	1	2,496
		1,465	2	2,405
		1,451	1	1,983
		1,503	2	2,298
		1,335	1	2,245
		1,218	1	2,231
		1,475	1	2,485
		1,275	1	2,245
		1,288	1	2,376
		1,286	1	2,320
		1,488	1	2,316
		1,370	1	2,394
		1,344	1	2,244

Figura 24 - Retinografia do coelho 6, marcas de fotocoagulação após 15 minutos da aplicação do LDI via transescleral OD (24a) e transpupilar OE (24b); tempo de 800 ms e potência de 500 mW

Tabela 12 - Medidas das áreas fotocoaguladas, após 15 minutos da aplicação do LDI no coelho 7, conforme potência e tempo utilizados e grau clínico da marca de FRT

Tempo (ms)	Potência (mW)	Área transescleral (OD) (mm ²)	Grau da lesão	Área transpupilar (OE) (mm ²)
1000	300	1,530	2	2,377
		1,595	2	2,504
		1,830	2	2,418
		1,565	2	2,582
		1,722	3	2,465
		1,491	2	2,739
		1,727	2	2,652
		1,579	2	2,354
		1,812	2	2,903
		1,754	3	2,756
		1,403	2	2,490
		1,641	2	2,492
		1,689	2	2,778
		1,763	2	2,522
		1,732	2	2,678
		1,478	2	2,465
		1,753	2	2,530
		1,440	1	2,243
		1,540	2	2,551
		1,532	2	2,418
		1,475	2	2,416
		1,687	2	2,557
		1,823	2	2,524
		1,658	2	2,720
		1,780	2	2,748
		1,632	2	2,776
		1,625	2	2,415
		1,589	2	2,579
		1,554	2	2,420
		1,509	2	2,616

Figura 25 - Retinografia do coelho 7, marcas de fotocoagulação após 15 minutos da aplicação do LDI via transescleral OD (25a) e transpupilar OE (25b), tempo de 1000 ms e potência de 300 mW

Tabela 13 - Medidas das áreas fotocoaguladas, após 15 minutos da aplicação do LDI no coelho 8, conforme potência e tempo utilizados e grau clínico da marca de FRT

Tempo (ms)	Potência (mW)	Área transescleral (OD) (mm ²)	Grau da lesão	Área transpupilar (OE) (mm ²)
1000	400	2,144	3	3,063
		1,989	2	3,212
		1,848	2	2,987
		2,141	3	3,166
		1,885	2	3,225
		2,084	3	3,057
		1,994	2	3,091
		1,704	2	2,811
		1,941	3	3,042
		1,905	2	3,055
		1,994	2	3,138
		1,574	2	3,130
		1,998	3	3,021
		1,621	2	3,290
		1,760	>3	2,933
		1,813	3	2,877
		1,932	3	2,969
		1,860	2	3,235
		1,907	2	2,906
		1,892	>3	2,856
		2,030	2	3,195
		1,842	2	3,145
		1,855	2	2,869
		1,911	3	3,058
		1,535	3	3,077
		1,784	3	2,931
		1,797	3	2,906
		1,842	3	2,992
		1,852	3	3,167
		1,638	3	2,961

Figura 26 - Retinografia do coelho 8, marcas de fotocoagulação após 15 minutos da aplicação do LDI via transescleral OD (26a) e transpupilar OE (26b); tempo de 1000 ms e potência de 400 mW

Tabela 14 - Medidas das áreas fotocoaguladas, após 15 minutos da aplicação do LDI no coelho 9, conforme potência e tempo utilizados

Tempo (ms)	Potência (mW)	Área transescleral (OD) (mm ²)	Grau da lesão	Área transpupilar (OE) (mm ²)
1000	500	1,268	2	2,247
		1,272	2	2,196
		1,386	2	2,183
		1,227	2	2,210
		1,454	2	2,034
		1,352	2	2,449
		1,210	1	2,213
		1,078	2	2,124
		1,206	2	2,078
		1,244	2	2,075
		1,363	2	2,190
		1,401	2	2,256
		1,264	2	2,195
		1,210	1	1,719
		1,184	2	2,034
		1,174	2	2,143
		1,217	2	2,280
		1,396	2	1,805
		1,247	2	2,187
		1,239	2	2,099
		1,477	2	2,404
		1,257	2	2,008
		1,228	2	1,963
		1,253	2	2,415
		1,316	2	2,171
		1,244	2	2,068
		1,503	3	2,308
		1,092	2	1,943
		1,139	2	2,127
		1,454	2	2,333

Figura 27 - Retinografia do coelho 9, marcas de fotocoagulação após 15 minutos da aplicação do LDI via transescleral OD (27a) e transpupilar OE (27b); tempo de 1000 ms e potência de 500 mW

8 REFERÊNCIAS

1. Bertolotti M. *The history of the laser*. Bristol, UK ; Philadelphia: Institute of Physics Publishing; 2005.
2. Vilela MAP, Corrêa-Meyer G, Corrêa-Meyer R. *Fotocoagulação Ocular*, 1 ed. Rio de Janeiro; 1994.
3. Provenzano J, Freitas JAH. *Laser em Oftalmologia*, 1 ed. Rio de Janeiro: Revinter; 1998.
4. Folk JC, Pulido JS. *Laser photocoagulation of the retina and choroid*. San Francisco: American Academy of Ophthalmology (Ophthalmology monographs); 1997
5. McHugh JD, Marshall J, Capon M, Rothery S, Raven A, Naylor RP. Transpupillary retinal photocoagulation in the eyes of rabbit and human using a diode laser. *Lasers Light Ophthalmol*. 1988; 2: 125-43.
6. L'Esperance FA, Jr. An ophthalmic argon laser photocoagulation system: design, construction, and laboratory investigations. *Trans Am Ophthalmol Soc*. 1968; 66: 827-904.
7. Meyer-Schwickerath G. *Light Coagulation*, 1st ed. St. Louis: C. V. Mosby; 1960.

8. Beetham WP, Aiello LM, Balodimos MC, Koncz L. Ruby-laser photocoagulation of early diabetic neovascular retinopathy: preliminary report of a long-term controlled study. *Trans Am Ophthalmol Soc.* 1969; 67: 39-67.
9. McHugh JD, Marshall J, Ffytche TJ, Hamilton AM, Raven A, Keeler CR. Initial clinical experience using a diode laser in the treatment of retinal vascular disease. *Eye.* 1989; 3 (Pt 5): 516-27.
10. Zweng HC, Flocks M, Kapany NS, Silbertrust N, Peppers NA. Experimental Laser Photocoagulation. *Am J Ophthalmol.* 1964; 58: 353-62.
11. Patz A, Maumenee AE, Ryan SJ. Argon laser photocoagulation. Advantages and limitations. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol.* 1971; 75(3): 569-79.
12. Smiddy WE, Fine SL, Green WR, Glaser BM. Clinicopathologic correlation of krypton red, argon blue-green, and argon green laser photocoagulation in the human fundus. *Retina.* 1984; 4(1): 15-21.
13. Blankenship GW. Red krypton and blue-green argon panretinal laser photocoagulation for proliferative diabetic retinopathy: a laboratory and clinical comparison. *Trans Am Ophthalmol Soc.* 1986; 84: 967-1003.

14. Brancato R, Menchini U, Pece A, Capoferri C, Avanza P, Radrizzani E. Dye laser photocoagulation of macular subretinal neovascularization in pathological myopia. A randomized study of three different wavelengths. *Int Ophthalmol*. 1988; 11(4): 235-8.
15. Mouries O, Vitrey D, Germain P, Bonnet M. [Use of diode laser in transcleral retinal photocoagulation]. *J Fr Ophtalmol*. 1993; 16(2): 108-13.
16. Brancato R PR. Applications of diode lasers in ophthalmology. *Lasers Light Ophthalmol*. 1987; 1: 113-23.
17. Provenzano J FJ. *Laser em Oftalmologia*: Rio Med Livros, 1998.
18. Puliafito CA, Deutsch TF, Boll J, To K. Semiconductor laser endophotocoagulation of the retina. *Arch Ophthalmol*. 1987; 105(3): 424-7.
19. Benner JD, Huang M, Morse LS, Hjelmeland LM, Landers MB, 3rd. Comparison of photocoagulation with the argon, krypton, and diode laser indirect ophthalmoscopes in rabbit eyes. *Ophthalmology*. 1992; 99(10): 1554-63.
20. Marshall J, Bird AC. A comparative histopathological study of argon and krypton laser irradiations of the human retina. *Br J Ophthalmol*. 1979; 63(10): 657-68.

21. Youn J, Cox TA, Herndon LW, Allingham RR, Shields MB. A clinical comparison of transscleral cyclophotocoagulation with neodymium: YAG and semiconductor diode lasers. *Am J Ophthalmol*. 1998; 126(5): 640-7.
22. Bressler NM, Bressler SB, Gragoudas ES. Clinical characteristics of choroidal neovascular membranes. *Arch Ophthalmol*. 1987; 105(2): 209-13.
23. McHugh D, England C, van der Zypen E, Marshall J, Fankhauser F, Fankhauser-Kwasnieska S. Irradiation of rabbit retina with diode and Nd:YAG lasers. *Br J Ophthalmol*. 1995; 79(7): 672-7.
24. Capone A, Jr., Diaz-Rohena R, Sternberg P, Jr., Mandell B, Lambert HM, Lopez PF. Diode-laser photocoagulation for zone 1 threshold retinopathy of prematurity. *Am J Ophthalmol*. 1993; 116(4): 444-50.
25. Chong LP, Ozler SA, de Queiroz JM, Jr., Liggett PE. Indocyanine green-enhanced diode laser treatment of melanoma in a rabbit model. *Retina*. 1993; 13(3): 251-9.
26. Cho HK, Park YW, Kim YJ, Shyn KH. Histopathologic and ultrastructural findings of photocoagulation lesions produced by transpupillary diode laser in the rabbit retina. *J Korean Med Sci*. 1993; 8(6): 420-30.

27. L'Esperance FA, Jr. The ocular histopathologic effect of krypton and argon laser radiation. *Am J Ophthalmol*. 1969; 68(2): 263-73.
28. Suh JH, Miki T, Obana A, Shiraki K, Matsumoto M. Effects of indocyanine green dye enhanced diode laser photocoagulation in non-pigmented rabbit eyes. *Osaka City Med J*. 1991; 37(2): 89-106.
29. Balles MW, Puliafito CA, D'Amico DJ, Jacobson JJ, Birngruber R. Semiconductor diode laser photocoagulation in retinal vascular disease. *Ophthalmology*. 1990; 97(11): 1553-61.
30. Gonçalves JCM, Farah ME. Retinopexia com laser de diodo transescleral na cirurgia de descolamento de retina. *Arq Bras Oftalmol*. 2003; 67: 23-6.
31. Kapran Z, Uyar OM, Bilgin BA, Kaya V, Cilsim S, Eltutar K. Diode laser transscleral retinopexy in rhegmatogenous retinal detachment surgery. *Eur J Ophthalmol*. 2001; 11(4): 356-60.
32. West JF, Gregor ZJ. Fibrovascular ingrowth and recurrent haemorrhage following diabetic vitrectomy. *Br J Ophthalmol*. 2000; 84(8): 822-5.
33. Arrindell EL, Wu JC, Wolf MD, Nanda S, Han DP, Wong EC, Abrams GW, Mieler WF, Hyde JS. High-resolution magnetic resonance imaging evaluation of blood-retinal barrier integrity following transscleral diode laser treatment. *Arch Ophthalmol*. 1995; 113(1): 96-102.

34. Bonnet M, Mouries O. [Pilot study of transscleral light coagulation of retinal breaks using diode laser]. *J Fr Ophthalmol*. 1994; 17(12): 739-45.
35. Smiddy WE, Hernandez E. Histopathologic results of retinal diode laser photocoagulation in rabbit eyes. *Arch Ophthalmol*. 1992; 110(5): 693-8.
36. Lima FE, Ávila M, Ribeiro C. Ciclofotocoagulação transescleral com laser de diodo em glaucoma neovascular. *Rev Bras Oftalmol*. 1996; 55(8): 67-73.
37. Lima CWL, Mello PAA, Prata Jr JA. Ciclofotocoagulação com laser diodo em glaucoma refratário, resultado a longo prazo. *Arq Bras Oftalmol*. 2003; 66(4): 449-52.
38. Autrata R, Rehurek J. Long-term results of transscleral cyclophotocoagulation in refractory pediatric glaucoma patients. *Ophthalmologica*. 2003; 217(6): 393-400.
39. Vogel A, Dlugos C, Nuffer R, Birngruber R. Optical properties of human sclera, and their consequences for transscleral laser applications. *Lasers Surg Med*. 1991; 11(4): 331-40.
40. Obana A, Lorenz B, Birngruber R. Transscleral and indirect ophthalmoscope diode laser retinal photocoagulation: experimental quantification of the therapeutic range for their application in the treatment of retinopathy of prematurity. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 1993; 231(7): 378-83.

41. Tso MO, Wallow IH, Elgin S. Experimental photocoagulation of the human retina. I. Correlation of physical, clinical, and pathologic data. *Arch Ophthalmol*. 1977; 95(6): 1035-40.
42. Benner JD, Galustian JC, Lim M, Hjelmeland L, Landers MB, 3rd, Morse LS. Comparison of techniques for transscleral diode photocoagulation in the rabbit. *Retina*. 1995; 15(3): 253-60.
43. Davis FA. The Anatomy and Histology of the Eye and Orbit of the Rabbit. *Trans Am Ophthalmol Soc*. 1929; 27: 400 2-441.
44. Olsen TW, Sanderson S, Feng X, Hubbard WC. Porcine sclera: thickness and surface area. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2002; 43(8): 2529-32.
45. Geeraets WJ, Berry ER. Ocular spectral characteristics as related to hazards from lasers and other light sources. *Am J Ophthalmol*. 1968; 66(1): 15-20.
46. Okamoto S, Takahashi H, Yoshinao F, Ozawa T. Laser diode application for transscleral photocoagulation. *Lasers Light Ophthalmol*. 1990; 3(1): 29-37.
47. Olsen TW, Aaberg SY, Geroski DH, Edelhauser HF. Human sclera: thickness and surface area. *Am J Ophthalmol*. 1998; 125(2): 237-41.

48. Rol P, Niederer P, Dürr P, Henchoz PD, Frankhauser F. Experimental investigations on the light scattering properties of the human sclera. *Lasers Light Ophthalmol.* 1990; 3(3): 201-12.
49. Pollack JS, Kim JE, Pulido JS, Burke JM. Tissue effects of subclinical diode laser treatment of the retina. *Arch Ophthalmol.* 1998; 116(12): 1633-9.
50. McHugh DA, Schwartz S, Dowler JG, Ulbig M, Blach RK, Hamilton PA. Diode laser contact transscleral retinal photocoagulation: a clinical study. *Br J Ophthalmol.* 1995; 79(12): 1083-7.
51. Han DP, Nash RW, Blair JR, O'Brien WJ, Medina RR. Comparison of scleral tensile strength after transscleral retinal cryopexy, diathermy, and diode laser photocoagulation. *Arch Ophthalmol.* 1995; 113(9): 1195-9.
52. Smith RS, Stein MN. Ocular hazards of transscleral laser radiation. I. Spectral reflection and transmission of the sclera, choroid and retina. *Am J Ophthalmol.* 1968; 66(1): 21-31.
53. Loewenstein A, Lamborne AN, Haller JA, de Juan E, Jr. Effect of scleral indentation on diode laser transscleral retinal photocoagulation. *Ophthalmic Surg Lasers.* 1998; 29(8): 658-62.

-
54. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 1977; 33(1): 159-74.
 55. Landis JR, Koch GG. A one-way components of variance model for categorical model. *Biometrics*. 1977; 33(1): 671-79.
 56. Wallow IH, Sponsel WE, Stevens TS. Clinicopathologic correlation of diode laser burns in monkeys. *Arch Ophthalmol*. 1991; 109(5): 648-53.
 57. Sasoh M, Smiddy WE. Diode laser endophotocoagulation. *Retina*. 1995; 15(5): 388-93.
 58. Smiddy WE, Hernandez E. Histopathologic characteristics of diode laser-induced chorioretinal adhesions for experimental retinal detachment in rabbit eyes. *Arch Ophthalmol*. 1992; 110(11): 1630-3.
 59. Aso S. [Retinochoroidal adhesions of diode laser endophotocoagulation lesions. 1. Histopathology of rabbit eyes]. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi*. 1992; 96(4): 479-85.
 60. Jennings T, Fuller T, Vukich JA, Lam TT, Joondeph BC, Ticho B, Blair NP, Edward DP. Transscleral contact retinal photocoagulation with an 810-nm semiconductor diode laser. *Ophthalmic Surg*. 1990; 21(7): 492-6.
 61. Peyman GA, Naguib KS, Gaasterland D. Trans-scleral application of a semiconductor diode laser. *Lasers Surg Med*. 1990; 10(6): 569-75.

-
62. Pollack A, Korte GE. Repair of retinal pigment epithelium and choriocapillaries after laser photocoagulation: correlations between scanning electron, transmission electron and light microscopy. *Ophthalmic Res.* 1997; 29(6): 393-404.
 63. Olk RJ. Argon green (514 nm) versus krypton red (647 nm) modified grid laser photocoagulation for diffuse diabetic macular edema. *Ophthalmology.* 1990; 97(9): 1101-12; discussion 1112-3.
 64. Yeh PT, Yang CM, Yang CH, Huang JS. Cryotherapy of the anterior retina and sclerotomy sites in diabetic vitrectomy to prevent recurrent vitreous hemorrhage: an ultrasound biomicroscopy study. *Ophthalmology.* 2005; 112(12): 2095-102.
 65. McLeod D. Entry site neovascularisation after diabetic vitrectomy. *Br J Ophthalmol.* 2000; 84(8): 810-1.
 66. Flaxel CJ, Larkin GB, Broadway DB, Allen PJ, Leaver PK. Peripheral transscleral retinal diode laser for rubeosis iridis. *Retina.* 1997; 17(5): 421-9.
 67. Seiberth V, Linderkamp O, Vardarli I. Transscleral vs transpupillary diode laser photocoagulation for the treatment of threshold retinopathy of prematurity. *Arch Ophthalmol.* 1997; 115(10): 1270-5.

68. Rudnicka AR, Burk RO, Edgar DF, Fitzke FW. Magnification characteristics of fundus imaging systems. *Ophthalmology*. 1998; 105(12): 2186-92.
69. Blumenkranz MS, Yellachich D, Andersen DE, Wiltberger MW, Mordaunt D, Marcellino GR, Palanker D. Semiautomated patterned scanning laser for retinal photocoagulation. *Retina*. 2006; 26(3): 370-6.