UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA MECÂNICA

FORMAÇÃO DE TROMBOS EM CATETERES DE HEMODIÁLISE: AVALIAÇÃO DAS ESTRUTURAS MICRO-MORFOLÓGICAS E ESTUDO NUMÉRICO DO COMPORTAMENTO DO ESCOAMENTO VENOSO

THABATA COAGLIO LUCAS

Belo Horizonte
2013

Thabata Coaglio Lucas

FORMAÇÃO DE TROMBOS EM CATETERES DE HEMODIÁLISE: AVALIAÇÃO DAS ESTRUTURAS MICRO-MORFOLÓGICAS E ESTUDO NUMÉRICO DO COMPORTAMENTO DO ESCOAMENTO VENOSO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Engenharia Mecânica

Área de concentração: Bioengenharia
Orientador: Prof. Dr. Rudolf Huebner
Colaboradores: Dr.Francesco Tessarolo e
Dr.Giandomenico Nollo
Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte
Escola de Engenahria da UFMG
2013

Lucas, Thabata Coaglio.
L933f Formação de trombos em cateteres de hemodiálise [manuscrito] : avaliação das estruturas micro-morfológicas e estudo numérico do comportamento do escoamento venoso / Thabata Coaglio Lucas. – 2013.
233 f., enc. : il.

Orientador: Rudolf Huebner.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Engenharia.

Anexos: f.216-233.
Bibliografia: f.205-215.

1. Engenharia mecânica – Teses. 2. Bioengenharia – Teses. 3. Microscopia eletrônica – Teses. I. Huebner, Rudolf. II. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Engenharia.
III. Título.

CDU: 621(043)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ENGENHARIA MECÂNICA
Av. Antônio Carlos, 6627 - Campus Universitário
31270-901 – Belo Horizonte – MG
Tel. :+55 31 3499.5145, Fax: +55 31 3443.3783
E-mail: cpgmec@demec.ufmg.br

"AVALIAÇÃO DAS ESTRUTURAS MICRO-MORFOLÓGICAS E ESTUDO NUMÉRICO DO COMPORTAMENTO DO ESCOAMENTO VENOSO."

THABATA COAGLIO LUCAS

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de **"Doutor em Engenharia Mecânica"**, na área de concentração de **"Bioengenharia".**

Tese aprovada em: 12 de abril de 2013.

Por:

Prof. Rudolf Huebner
Orientador - Departamento de Engenharia Mecânica/UFMG

Prof. Marcos Pinotti Barbosa
Departamento de Engenharia Mecânica/UFMG

Dr. Aron José Pazin De Andrade
Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia/USP

Prof. Túlio Pinho Navarro
Escola de Medicina/UFMG

Prof. Joseph Fabiano Guimaraes Santos
Hospital Santa Casa- IPSEMG

AGRADECIMENTOS

AGRADEÇO à **Deus** por me conceder sabedoria e discernimento durante todo o percurso do doutrorado.

AGRADEÇO ao meu orientador **Prof. Dr. Rudolf Huebner** pela orientação, ensinamentos, dedicação, paciência e amizade.

AGRADEÇO à equipe do **Laboratório de Bioengenharia da UFMG** em epecial aos alunos que trabalharam nesta pesquisa, Daniel Leite de Oliveira, Janaina Macedo e Victor Jakitsch.

AGRADEÇO ao **Dr. Giandomenico Nollo** e **Dr. Francesco Tessarolo** pela dedicada orientação e ensinamentos durante o doutorado sanduiche na cidade de Trento/Italia e a toda equipe do "*Interdepartmental Centre for Biomedical Technologies*" (BIOtech).

AGRADEÇO à **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nivel Superior (CAPES)** pela bolsa de doutorado sanduiche no período de 14 de julho de 2011 a 14 de julho de 2012 na cidade de Trento (Italia).

AGRADEÇO à **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais** (FAPEMIG) pela bolsa de doutorado durante o periodo de doutorado no departamento de Engenharia Mecânica/UFMG

AGRADEÇO ao **colegiado de Pós-Graduação da Engenharia Mecânica** da UFMG pelo apoio e orientação durante o doutorado.

AGRADEÇO à minha **família** pelo amor, apoio e compreensão nos momentos de dificuldade e por me ensinar a não deisitir dos meus objetivos. A minha eterna gratidão por me tornar a pessoa que sou.

" De tudo ficaram três coisas: a certeza de que estamos sempre começando…..a certeza de que é preciso continuar…. a certeza de que podemos ser interrrompidos antes de terminarmos…..façamos da interrupção um caminho novo…….da queda uma dança….do medo uma escada….do sonho uma ponte……da procura um encontro…."

Fernando Sabino

"Nada façais por contenda ou por vanglória, mas por humildade, considerando os outros superiores a si mesmo, nem cuidando cada um do que é seu, mas também o que é dos outros".

Filipenses 2, 1- 4

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS---------- 9
LISTA DE GRÁFICOS---------- 18
LISTA DE TABELAS---------- 20
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS---------- 22
RESUMO---------- 23
1 INTRODUÇÃO---------- 25
1.1 Objetivos..... 29
1.1.1 Objetivo geral..... 29
1.1.2 Objetivo específico..... 29
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA---------- 30
2.1 Cateteres venosos centrais e hemostasia sanguínea..... 30
2.2 Componentes micro-estruturais do trombo..... 38
2.3 Influências do escoamento venoso na formação de tecido trombótico..... 41
2.4 Escomento não-Newtoniano e newtoniano..... 44
3 MATERIAIS E MÉTODOS---------- 48
3.1 Geração do modelo tridimensional..... 48
3.2 Elementos e malha..... 54
3.3 Condições de contorno e simulação numérica..... 56
3.4 Coleta de dados..... 64
3.5 Preparo e armazenamento do material..... 65
3.6 Protocolo MEV..... 67
3.7 Protocolo Microscopia de Varredura a Laser de Dois Fótons..... 72
3.8 Protocolo dos estudos histológicos..... 75
3.9 Processamento de imagens e microscopia óptica em transmissão de luz e de fluorescência..... 78
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES---------- 84
4.1 Estudo numérico do efeito do escoamento venoso na parede externa do CVC não tunelizado..... 84
4.2 Estudo numérico do escoamento no interior da veia e no interior do CVC desobstruído

e obstruído nos regimes laminares…… 102
4.3 Estudo numérico do escoamento no interior da veia e no interior do CVC desobstruído e nos regimes laminares e turbulentos…….……. 124
4.4 Estudo numérico do escoamento no interior da veia e no interior do CVC desobstruído e obstruído e nos regimes laminares e turbulentos de fluidos não-Newtonianos……..... 136
4.5 Análise micro-morfológica do trombo……..…..… 170
4.6 Análise histológica do trombo……..…. 186
5 CONCLUSÃO---------- 199
6 TRABALHOS FUTUROS---------- 202
7ABSTRACT---------- 203
8 REFERÊNCIAS---------- 205
ANEXOS---------- 216

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 2.1: Resumo esquemático das vias de coagulação intrínseca e extrínseca quando na presença do CVC…….33

FIGURA 3.1: Identificação das veias jugulares internas na secção transversal do programa *Visible Human Project*®……..49

FIGURA 3.2: Curvas polinominais referentes às jugulares internas direitas e esquerdas. Posicionamento das imagens em planos paralelos e esboço do início das veias cava superior e braquicefálicas. Início da formação do sólido das veias jugulares internas direita e esquerda…….50

FIGURA 3.3: Geometria gerada no solidworks® comparada à original do programa *VH Dissector Pro*®..…….51

FIGURA 3.4: Geometria das veias com o cateter inserido em seu interior e do CVC não tunelizado…….…52

FIGURA 3.5: Geometria venosa. Cateter desobstruído (a) e obstruído (b). Os números indicam a ordem dos orifícios laterais. Três orifícios venosos e quatro orifícios arteriais. Cortes transversais feitos no final da extensão do cateter, indicado com 'chaves' no CVC desobstruído (c) e obstruído (d). Imgens fotográficas com fundo vermelho apresentam os orificios venosos e arteriais do CVC…….…..53

FIGURA 3.6: Malha gerada da geometria venosa e do cateter. Imagem ampliada dos elementos prismáticos próximo à parede do vaso……..54

FIGURA 3.7: Malha gerada da veia e do cateter inserido em seu interior…….…....55

FIGURA 3.8: Orifícios venosos ocluídos por trombos. Cateter não tunelizado no topo e tunelizado na parte inferior. Linhas tracejadas indicam o ponto de corte das amostras obtidas para as micrsocopias. Menor grade de 1mm……..…66

FIGURA 3.9: Cateter não tunelizado com trombo nos orifícios venoso (a). Secção transversal do cateter não tunelizado (b). Cateteter tunelizado com orifício lateral ocluído (c). Secção transversal do cateter tunelizado (d)…….66

FIGURA 3.10: Microscopia eletrônica de varredura ambiental (*XL 30 ESEM FEG, FEI-Philips, Nederland)***.** Câmera de inserção da amostra, aonde foi inserido os cortes dos cateteres. Indicação do detector de elétrons secundários……....69
FIGURA 3.11: Montagem das micrografias para análise semi-quantitativa. Região central do trombo no interior do cateter amplificada. Magnificação original 500x…….70
FIGURA 3.12: Diferentes micro-morfologias encontradas no trombo. Da parte superior da imagem a inferior: a) placa de fibrina, b) rede de fibrina, c) fibra de fibrina, d) plaquetas aderida à fibrina, e) Eritrócitos, f) Leucócitos. Magnificação original 2000x……..….71
FIGURA 3.13: Microscópio de varredura a laser de dois fótons (Ultima IV, Prairie Technologies) equipado com laser pulsado ultra-curto (Mai Tai Deep See HP, Spectra-Physics) como fonte de excitação……...73
FIGURA 3.14: Análise na microscopia de luz. Coloração de Cartairs, (a) Magnificação original 40x. Plaquetas (em azul acizentado a marinho), fibrina (vermelho brilhante) e eritrócitos (amarelo) (b) 100x; (c) 200x. Escala de barra: 50μ……...78
FIGURA 3.15: Imagens em microscopia de fluorescência convertidas para 8 bits numa escala de cinza…….…….80
FIGURA 3.16: Área total do trombo em preto obtida por segmentação da imagem. Histo-grama (0-74) representa a área total do trombo. Histograma (75-101) representará uma determinada área do tecido de alta fluorescência……81
FIGURA 3.17: Limiarização binária: Definição da área altamente fluorescente e daquela com pouca fluorescência……..…82
FIGURA 3.18: Processamento das imagens: a) coradas em H&E, b) imagem em fluorescência, c) área total do trombo em branco, d) Indicação da área altamente fluorescente (branco) e daquela com baixa fluorescência (negro)…….……83
FIGURA 4.1: Distribuição da velocidade nas linhas de corrente no pico da sístole (t=0,4s) no modelo não- Newtoniano com cateter (a) e sem cateter (b). Final da sístole (t=0,7s) com cateter(c) e sem cateter(d)……85
FIGURA 4.2: Distribuição da tensão de cisalhamento na parede do cateter no modelo não-Newtoniano no pico da sístole (t=0,42s) e início da diástole (t=0,75s) durante o ciclo cardíaco…….……...86

FIGURA 4.3: Distribuição da taxa de deformação do modelo não-Newtoniano com cateter (a), newtoniano com cateter (b), não-Newtoniano sem cateter (c) e newtoniano sem cateter (d)……..…...88
FIGURA 4.4: Secções transversais do escoamento em regime laminar do fluido não-Newtoniano na presença do cateter (a) e na ausência do cateter na veia (b), em quatro diferentes tempos do ciclo cardíaco……90
FIGURA 4.5: Secções transversais do escoamento em regime laminar do fluido newtoniano na presença do cateter (a) e na ausência do cateter na veia (b), em quatro diferentes tempos do ciclo cardíaco……91
FIGURA 4.6: Comparação do perfil do fluido não-Newtoniano em regimes laminares e turbulentos com e sem cateter. A imagem apresenta o plano em que os dados de tensão de cisalhamento foram obtidos para a construção do gráfico…….92
FIGURA 4.7: Distribuição da tensão de cisalhamento do fluido newtoniano em regimes laminares e turbulentos, com a presença e ausência do cateter. A imagem representa o plano em que os dados de tensão de cisalhamento foram obtidos…….94
FIGURA 4.8: Distribuição do perfil de velocidade no escoamento em regimes laminares e turbulentos do fluido não-Newtoniano. A imagem apresenta o plano em que os resultados foram obtidos……...…96
FIGURA 4.9: Distribuição da velocidade no decorrer dos planos inseridos na veia com e sem cateter no fluido não-Newtoniano…….…..……98
FIGURA 4.10: Perfil dos vetores de velocidade do cateter desobstruído (a) e do cateter obstruído parcialmente (b)…….103
FIGURA 4.11: Vetores do perfil da velocidade nos orifícios venosos de saída do CVC desobstruído……...……104
FIGURA 4.12: Vetores do perfil da velocidade nos orifícios venosos de saída do CVC desobstruído……..……..…105
FIGURA 4.13: Tensão de cisalhamento no orificio venoso obstruído (a) e desobstruído (b). As setas inseridas nas fotografias indicam os orifícios em que foi feito o estudo numérico……..……..106

FIGURA 4.14: Micrografias das camadas de fibrina ligadas à parede interna do orifício do CVC (a). Fibrina na região externa do trombo (b). Fibrina na região interna do lúmen do CVC (c). Magnificação original 500x, 2000x……..…….107
FIGURA 4.15: Velocidade no orifício venoso do cateter desobstruído (a) e do cateter obstruído (b) no tempo t=0,4s…….……..…109
FIGURA 4.16: Planos inseridos na região de obstrução venosa. Imagens (a) e (b) apresentam a pressão do cateter desobstruído e obstruído parcialmente respectivamente
……111
FIGURA 4.17: Distribuição da pressão no cateter desobstruído (a) e no cateter obstruído (b) nos escoamentos em regimes laminares no interior do lúmen do cateter…….……....112
FIGURA 4.18: Distribuição dos valores de velocidade nos orifícios arteriais 1, 3 e 4 com obstrução (a,c,e) e sem obstrução (b,d,f). Geometria do CVC, apresentando os orifícios arteriais 1,3 e 4……...113
FIGURA 4.19: Distribuição dos valores de velocidade no orifício central do cateter com obstrução (a) e sem obstrução (b)…….…….114
FIGURA 4.20: Distribuição dos valores de pressão no cateter com obstrução arterial e venosa (a). Valores de pressão do cateter desobstruído (b). O gráfico apresenta a variação média de pressão no interior do cateter……..……...116
FIGURA 4.21: Distribuição dos valores de velocidade no interior do lúmen do cateter com obstrução arterial e venosa (a) e do cateter desobstruído (b). Gráfico dos valores de velocidade no decorrer da extensão do cateter…….…….….117
FIGURA 4.22: Planos invertidos inseridos na região da ponta do cateter. Cateter obstruído (a) e desobstruído (b)…….……118
FIGURA 4.23: Distribuição da velocidade no plano invertido inserido na região da ponta do cateter no tempo t=0,4s. Cateter obstruído (a) e desobstruído (b)……...119
FIGURA 4.24: Distribuição da velocidade no plano inserido na região da ponta do cateter no tempo t=0,7s. Cateter obstruído (a) e desobstruído(b)……..……... 120
FIGURA 4.25: Distribuição da velocidade no plano inserido em área de obstrução venosa do cateter obstruído (a) e desobstruído (b)…….……...122

FIGURA 4.26: Distribuição da velocidade no plano inserido na região arterial em que se inseriu uma obstrução (a) e na região correspondente no cateter em que não se inseriu obstrução (b)……..…..……124
FIGURA 4.27: Distribuição dos vetores de velocidade no cateter inserido no escoamento em regime laminar (a) e no escoamento em regime turbulento (b) ……...……..125
FIGURA 4.28: Distribuição dos vetores nos orifícios de saída do CVC no escoamento em regime laminar (a) e no escoamento em regime turbulento (b)… ……..….126
FIGURA 4.29: Distribuição da pressão no escoamento em regime turbulento (a) e no escoamento em regime laminar (b)…… ……..…..127
FIGURA 4.30: Perfil de velocidade no escoamento em regime laminar (a) e no escoamento em regime turbulento (b) ……...128
FIGURA 4.31: Distribuição do perfil de velocidade no escoamento em regime turbulento (a) e no escoamento em regime laminar (b) …….128
FIGURA 4.32: Distribuição da velocidade no orifício venoso no escoamento em regime turbulento (a) e no laminar (b) ……..131
FIGURA 4.33: Distribuição da pressão no escoamento em regime turbulento (a) e laminar (b)…….. 134
FIGURA 4.34: Perfil das linhas de corrente no interior da veia e do CVC. Da imagem superior à inferior: cateter desobstruído e cateter com parcial obstrução no escoamento laminar. As imagens ampliadas apresentam os vetores próximos aos orifícios venosos e arteriais. Imagens da microscopia de varredura a laser de dois fótons: placa e rede de fibrina circundada por glóbulos brancos (a). As marcações em circulo de vermelho indicam contorno parede interna do orifiio venoso. A seta dupla delimita a prede do orifício. A imgem (b) representa a fibrina hidratada ao redor da parede interna do orifício venoso. As setas em vermelho indicam a mudança de direção das fibras. MEV em (c) apresenta a placa de fibrina próxima a região de borda do cateter e rede de fibrina em direção ao centro. Magnificação original 1000x……...…..138
FIGURA 4.35: Perfil das linhas de corrente no interior da veia e do CVC no escoamento turbulento. Da imagem superior à inferior: cateter desobstruído e cateter com parcial

obstrução. As imagens ampliadas apresentam os vetores próximos aos orifícios venosos e arteriais…….,……..140
FIGURA 4.36: Fibras de fibrina contorcidas e assimétricas formando emaranhados heterogêneos. Microscopia eletrônica de varredura. Magnificação original 4000x……..142
FIGURA 4.37: Distribuição da tensão de cisalhamento na parede do terceiro orificio venoso do cateter no escoamento laminar e turbulento. As imagens (a) e (b) representam o escoamento em regime laminar de um cateter desobstruído e obstruído respectivamente. As imagens (c) e (d) representam o escoamento em regime turbulento de um cateter desobstruído e obstruído respectivamente. As imagens (e) e (f) representam a tensão de deformação na superfície externa do terceiro orificio venoso não obstruído (e) e obstruído (f). Micrografias da parede interna do cateter (g), imagens ampliadas (h) e (i) das camadas de fibrinas ligadas à parede interna do orificio venoso. Microscopia eletrônica de varredura. Magnificação original 100x, 500x e 1000x……146
FIGURA 4.38: Tensão de cisalhamento na parede interna dos orifícios arteriais no escoamento em regime laminar no tempo t=0,4s. As figuras (a) e (b) apresentam a tensão de cisalhamento na parede do orificio arterial 4 do cateter desobstruído e obstruído respectivamente. As figuras (c) e (d) apresentam as imagens do orifio arterial 3 no cateter desobstruído e obstruído respectivamente. As figuras (e) e (f) apresentam a tensão de cisalhamento na parede do orifico arterial 1 no cateter desobstruído e obstruído respectivamente……..148
FIGURA 4.39: Distribuição da tensão de cisalhamento no orifício venoso do CVC. Tensão de cisalhamento no escoamento em regime laminar no orifício desobstruído (d) e obstruído (e) do cateter. Tensão de cisalhamento turbulenta no orifício desobstruído (f) e obstruído (g) do cateter. Velocidade no escoamento em regime laminar do cateter desobstruído (h) e obstruído (i). Escoamento em regime turbulento de um cateter desobstruído (j) e obstruído (l). Fotografia do orifício venoso mostra as camadas de fibrina adsorvida na parede do cateter (a) e (b). Trombo maduro com espessa placa de fibrina na borda do cateter e glóbulos vermelhos coberto de rede de fibrina no centro (c). Diferentes arranjos da fibra de fibrina (d): a seta de cor branca apresenta fibras de fibrina mais interligadas e espessas e a

seta de cor preta apresenta a rede de fibrina formando um emaranhado com aparência de uma malha. Magnificação original 100x, 500x e 1000x…….…….149
FIGURA 4.40: Microscopia de varredura a laser de dois fotons:placa de fibrina e rede de fibrina em direção ao centro.MEV: rede de fibrina entrelaçadas formando uma placa compacta. Magnificação original 500x……..150
FIGURA 4.41: Distribuição das fibras de fibrina: as três imagens superiores apresentam as fibras mais lisas e seguindo uma direção longitudinal no interior do lúmen do cateter.As três imagens inferiores apresentam as fibras de fibrina assimétrica na parede interna do orifício venoso. Magnificação original 40x, 500x,1000x e 2000x…….152
FIGURA 4.42: Distribuição dos contornos das tensões de cisalhamento nos orifícios arteriais no escoamento em regime laminar (t=0,4s). Imagens (a) e (b) representam a tensão de cisalhamento no orificio arterial 4 de um cateter obstruído e desobstruído respectivamente. Imagens (c) e (d) representam os contornos do orificio arterial 3 do cateter desobstruído e obstruído respectivamente. Imagens (e) e (f) apresentam os contornos no orificio arterial 1 de um cateter desobstruído e obstruído respectivamente…….…...153
FIGURA 4.43: Distribuição da velocidade nos planos inseridos na região anterior, mediana e posterior à obstrução venosa. As imagens (e) e (f) apresentam planos inseridos em cateteres obstruídos e desobstruídos respectivamente em regime laminar. As imagens(g) e (h) apresentam planos inseridos em cateteres obstruídos e desobstruídos respectivamente em regime turbulento. Os gráficos a e c correspondem ao perfil de velocidade do plano selecionado inseridos nas imagens (e) e (g). Os gráficos (b) e (d) correspondem ao perfil de velocidade do plano posterior à obstrução nas imagens (b) e (d) ……....161
FIGURA 4.44: Distribuição da velocidade no orificio situado na ponta central do cateter desobstruído (a) e parcialmente obstruído (b) no escoamento em regime laminar. Planos invertidos inseridos na ponta do cateter desobstruído (c) e obstruído (d)…..……...163
FIGURA 4.45: Distribuição da velocidade no plano invertido em região de obstrução venosa, no cateter desobstruído (a) e obstruído (b). Plano invertido inserido em região de obstrução arterial no cateter desobstruído (c) e obstruído (d)……164

FIGURA 4.46: Distribuição das fibras de fibrina aderidas ao cateter. As imagens ampliadas apresentam as plaquetas aderidas às fibras de fibrina em grande quantidade na borda do cateter. Magnificação original 100x, 500x e 2000x……..……167
FIGURA 4.47: Diferença do tecido trombótico a partir da superfície (a, d) até as camadas sub-superficiais (b, c, e, f). Camadas superficiais são geralmente ricas em fibrina e camadas subjacentes contem mais glóbulos vermelhos. Camadas sub-superficiais foram coletadas 4μm (b), 8μm (c), 12μm (e), 24μm (f) abaixo da superfície do trombo. Colunas esquerda e direita apresentam áreas rica em glóbulos vermelhos (setas finas) e glóbulos brancos (setas espessas) respectivamente. Campo de visão: 120μm x 120μm……..……..172
FIGURA 4.48: Micro-estruturas presentes na camada superfícial do trombo. Escala da barra: 50μm……173
FIGURA 4.49: Superficie do trombo: borda do trombo coberta de placa de fibrina e centro coberto de eritrócitos……..174
FIGURA 4.50: Imagens de MEV da morfologia do trombo em dois diferentes tempos de permanência: cateter CVC tunelizado com 1080 dias de permanência (a, c); não tunelizado com 5 dias de permanência na veia (b,d). As setas indicam cristais de colesterol. Magnificação original: 25x (a, b), 500x (c,d) ……..175
FIGURA 4.51: Cateter com 12 dias de permanência e a imagem ampliada da fibrina (a) e (b) respectivamente. Cateter com trombo no interior do orifício venoso com 37 dias de permanência (c) e a imagem ampliada da fibrina (d). Cateter tunelizado com 180 dias de permanência (e) e imagem ampliada da fibrina contendo glóbulos vermelhos e brancos (f). Magnificação original 100x e 500x……..…….177
FIGURA 4.52: Cateteres venosos tunelizados com 151 e 183 dias de permanência. Imagem ampliada apresenta glóbulos vermelhos recobertos por fibrinas no cateter de 151 dias e no cateter de 183 dias. Observa-se a presença de glóbulos vermelhos e brancos que não estavam cobertos por fibrinas. Magnificação original 1000x, 4000x…….180

FIGURA 4.53: Comparação das micrografias da placa de fibrina e da rede de fibrina com as imagens da microscopia de varredura a laser de dois fótons. Placa de fibrina (verde), rede de fibrina (azul). Magnificação original 1000x……..…182
FIGURA 4.54: Comparação das micrografias da placa de fibrina coberta de glóbulos vermelhos e cristais de colesterol comparada à microscopia de varredura a laser de dois fótons (em lilaz). Rede de fibrinas e plaquetas em MEV comparada a microscopia de varredura a laser de dois fótons (vermelho). Magnificação original 1000x……...183
FIGURA 4.55: Método de Carstairs (a, d, g) plaquetas (azul marinho acizentado), fibrina (vermelho) e glóbulos vermelhos (amarelo). Microscopia de fluorescência (b, e, h área altamente fluorescente e área de baixa fluorescência). Coloração H&E (c, f, i). Magnificação 40x. Escala da barra: 50µm……..…189
FIGURA 4.56: Coloraçao de Carstairs: plaquetas (azul marinho acizentado), fibrina (vermelho) e glóbulos vermelhos (amarelo). Magnificação original 40x e 100x. Escala da barra:50µm…….190
FIGURA 4.57: Coloraçao de Carstairs: plaquetas (azul marinho acizentado), fibrina (vermelho) e glóbulos vermelhos (amarelo). (F) fibrina e (GV) de glóbulos vermelhos. As setas indicam a presença de plaquetas em azul marinho, aderidas à fibra de fibrina. Magnificação original 40x, 100x e 200x. Escala da barra: 50µm…….……...190

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 3.1: Condições de contorno para a veia no escoamento transiente. Perfil da curva de velocidade de entrada nas veias jugulares internas direita e esquerda. S corresponde à sístole, D corresponde à diástole, A corresponde à contração do átrio e V representa a curva de transição do sobreenchimento do átrio contra a vávula tricúspede.……..……62
GRÁFICO 3.2: Condições de contorno para a veia no escoamento transiente. Perfil da pressão de saída no átrio direito. S corresponde à sístole, D corresponde à diástole, A corresponde à contração do átrio e V representa a curva de transição do sobreenchimento do átrio contra a vávula tricúspede……62
GRÁFICO 3.3: Distribuição do perfil de velocidade das veias consideradas como condições de contorno de entrada……..63
GRÁFICO 4.1: Perfil de velocidade do orificio venoso do cateter desobstruído (a). Perfil de velocidade do orifício venoso do cateter obstruído (b)……..…110
GRÁFICO 4.2: Distribuição da velocidade no plano invertido inserido na região externa da ponta do cateter……...119
GRÁFICO 4.3: Perfil de tensão de cisalhamento no escoamento do plano inserido na região de ponta do cateter com e sem obstrução……..121
GRÁFICO 4.4: Perfil de velocidade no escoamento do plano inserido na região de obstrução venosa do cateter com e sem obstrução……...122
GRÁFICO 4.5: Distribuição da velocidade no plano inserido na região de obstrução arterial no cateter obstruído e desobstruído…….123
GRÁFICO 4.6: Perfil de velocidade no orifício central da ponta do cateter no escoamento laminar e turbulento…….129
GRÁFICO 4.7: Distribuição da pressão no escoamento em regime laminar e turbulento no orificio central do CVC…….……130
GRÁFICO 4.8: Distribuição de velocidade no orificio venoso do escoamento em regime laminar e turbulento…….……....130

GRÁFICO 4.9: Perfil de velocidade no orifício arterial 4 no escoamento laminar e no turbulento……132
GRÁFICO 4.10: Perfil de velocidade no orifício arterial 3 no escoamento laminar e no turbulento……....132
GRÁFICO 4.11: Perfil de velocidade no orifício arterial 1 no escoamento laminar e no turbulento……133
GRÁFICO 4.12: Distribuição da velocidade no plano invertido inserido na região arterial no escoamento laminar e turbulento…….…..135
GRÁFICO 4.13: Perfil de tensão de cisalhamento no escoamento laminar e turbulento no plano inserido na região arterial……....136
GRÁFICO 4.14: Perfil de velocidade no escoamento laminar e turbulento no plano inserido na região de orifício venoso……..….136
GRÁFICO 4.15: *Box plot* das características micromorfologicas dos trombos quantificados pela MEV. Total de fibrina acumulada: fibras de fibrina, rede de fibrina e placa de fibrina……..171
GRÁFICO 4.16: *Box plot* da porcentagem de fibrina fluorescente versus o tempo de permanência do CVC…….……..192

LISTA DE TABELAS E QUADROS

QUADRO 3.1: Distribuição das constantes do modelo k-ω *Shear Stress Transport(SST)*……..…58

TABELA 4.1: Distribuição da tensão de cisalhamento nos planos inseridos no interior da veia jugular interna direita nos regimes laminares e turbulentos não-Newtoniano……..…..…….99

TABELA 4.2: Distribuição da tensão de cisalhamento nos planos inseridos no interior da veia jugular interna direita nos regimes laminares e turbulentos newtoniano….…….….100

TABELA 4.3: Valores da mediana de velocidade entre os planos inseridos no interior da veia jugular direita nos regimes laminares e turbulentos……....101

TABELA 4.4: Valores de vazão mássica nos orifícios de entrada e saída dos CVCs…….....103

TABELA 4.5: Distribuição dos valores de pressão nos regimes laminares e turbulentos……..134

TABELA 4.6: Distribuição da tensão de cisalhamento na parede e da taxa de deformação na parede interna dos orifícios laterais durante o ciclo cardíaco……..……...148

TABELA 4.7: Distribuição da tensão de cisalhamento e da taxa de deformação nos orifícios laterais do CVC durante o ciclo cardíaco…….…….…...152

TABELA 4.8: Distribuição dos valores de velocidade nos regimes laminares e turbulentos no interior dos planos inseridos na região anterior, mediana e posterior à obstrução venosa……..……..162

TABELA 4.9: Distribuição dos valores de velocidade nos orificios laterais arteriais nos regimes laminares e turbulentos durante o ciclo cardíaco……165

TABELA 4.10: Distribuição dos valores de pressão nos orfícios laterais do CVC……..…167

TABELA 4.11: Distribuição das variáveis: tempo de permanência, plaquetas, PT e PTT obtidos na remoção do CVC comparados com a fibrina total analisada em MEV e em microscopia de fluorescência……..……...196

TABELA 4.12: Valores do tempo de permanência do CVC não tunelizado comparado à fibrina total obtida pela microscopia de fluorescência. Estratificação do tempo em grupos < 17 dias e ≥ 17 dias de inserção do CVC…….197

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CVC	Ceteter Venoso Central
CDL	Cateter de duplo lúmen
DRC	Doença Renal Crônica
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
vWF	Von Willebrand Factor
CY	Carreau Yassuda
H&E	Hematoxilina e Eosina
NLM	*National Library of medicine*
CFD	*Computational Fluid Mechanics*
MVF	Método de Volumes Finitos
SPSS	*Satistical Package for Social Science*
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
Labbio	Laboratorio de Bioengenharia
Biotech	*Interdepartmental Center on Biomedical Technologies*

RESUMO

LUCAS, T. C. **Formação de trombos em cateteres de hemodiálise:** avaliação das estruturas micro-morfológicas e estudo numérico do comportamento do escoamento venoso. 2013.233f.Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica)-Escola de Engenharia,Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

Embora os orifícios laterais dos cateteres venosos centrais viabilizem uma vazão adequada para a realização da hemodiálise, eles podem favorecer o distúrbio no escoamento proporcionando um ambiente hemodinâmico crítico que estimula o desenvolvimento da fibrina e do trombo venoso. Além disso, condições hemodinâmicas alteradas podem influenciar na estrutura e conformação da fibrina no interior dos orifícios laterais. Objetivou-se avaliar as estruturas micro-morfológicas do trombo venoso *in vivo* e o comportamento do escoamento venoso em presença de cateteres venosos centrais. Utilizou-se a dinâmica dos fluidos computacional em regime laminar e turbulento para comparar o escoamento num cateter parcialmente obstruído com um desobstruído. Aplicou-se as técnicas de microscopia eletrônica de varredura, microscopia de varredura a laser de dois fotons, microscopia de fluorescência e análise histológica para entender as características micro-morfologicas do trombo *in vivo* e comparar a disposição do tecido com as forças hidrodinâmicas do escoamento venoso. Observou-se que os orificios laterais manteram um limiar de tensão de cisalhamento elevado durante o ciclo cardíaco. A taxa de deformação média na superfície interna do orifício venoso em regime laminar aumentou de 8047,46 ±18,21 s^{-1} para 12400,02 ± 7,40 s^{-1} quando o cateter estava obstruído e, no regime turbulento aumentou de 6449,06 ± 18,31 s^{-1} para 10497,04 ± 4,62 s^{-1}. Embora os valores de taxa de deformação tenham sido menores no regime turbulento quando comparado ao laminar, os valores ainda são considerados elevados de acordo com parâmetros fisiológicos. A mediana de pressão no orifício central cateter em regime laminar foi de 1056 (649 **-** 2120) Pa para o cateter não obstruído e de 2163 (1557**-**3231) Pa para o cateter obstruído. Um jato de maior pressão de saída pode aumentar a carga mecânica das células endoteliais e estimular o desenvolvimento de fibrina. A conformação da fibrina está relacionada com a complexidade da dinâmica do escoamento: presença de vórtices, áreas de recirculação e separação de escoamento associada a regiões de alta tensão de cisalhamento e taxa de deformação. Os orifícios venosos

apresentaram maior distúrbio no escoamento quando comparado aos arteriais. Observou-se uma associação entre a conformação da fibrina avaliada em microscopia eletrônica de varredura e em microscopia de varredura a laser de dois fótons e a tensão de cisalhamento na parede e a taxa de deformação no interior dos orifícios venosos. Pelo método de quantificação da fibrina em microscopia de fluorescência, a fibrina foi associada à alta fluorescência enquanto que os glóbulos vermelhos foram associados à baixa fluorescência. Finalmente, as técnicas apresentadas neste estudo mostraram-se adequadas para a caracterização do trombo e pode ser aplicada para o densevolvimento e testes de novas estratégias que limitam a formação do trombo no interior do orifício venoso.

Palavras chaves: Cateter venoso central. Dinâmica dos fluidos computacional. Microscopia eletrônica. Microscopia a laser de dois fótons. Trombo. Bioengenharia.

1 INTRODUÇÃO

Mais de 300.000 individuos nos Estados Unidos fazem uso de acesso vascular para o tratamento com hemodiálise (BAMBAUER *et al.*, 2011). Além disso, mais de 70% dos pacientes que iniciam hemodiálise nos Estados Unidos apresentam cateteres venosos centrais (CVC) tunelizados como primeira opção de acesso sanguíneo (BAMBAUER *et al.*, 2011). De acordo com análises estatísticas dos Estados Unidos, os CVCs são utilizados em 65% dos pacientes incidentes de hemodiálise e em 25% da população prevalente que fazem uso de hemodiálise (BAMBAUER *et al.*, 2011).

No Brasil, a prevalência de pacientes mantidos em programa crônico de diálise dobrou nos últimos anos (SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA, 2010). O Brasil contabilizou 54.500 pacientes em 2002 e 73.500 em 2006. A incidência de novos pacientes cresce cerca de 8% ao ano (SOCIEDADE DRASILEIRA DE NEFRLOGIA, 2010). O censo realizado em 2011 em pacientes de diálise relatou que 50.128 pacientes têm sido tratados com hemodiálise e que 20% desses pacientes fizeram uso de cateteres venosos centrais durante todo o período de hemodiálise (SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFRLOGIA, 2010). Além disso, estima-se 18.972 novos pacientes por ano para iniciar o tratamento com hemodiálise, e que 10 milhões de brasileiros têm algum grau de doença renal crônica (SOCIEDADE DRASILEIRA DE NEFRLOGIA, 2010). Embora o acesso vascular seja essencial para fornecer uma eficiente terapia na diálise, alguns pacientes que fazem uso de CVC apresentam complicações como infecções e formação de trombos (ASH, 2008; BESABARD; PANDEY, 2011; LEE *et al.*, 2012).

Além disso, cerca de 40% da não funcionalidade dos cateteres venosos são atribuídas à trombose venosa e a formação de bainha de fibrina (BAMBAUER *et al.*, 2012). Tais complicações são as principais causas de hospitalização e morbidade em pacientes com insuficiência renal crônica e representam 16 a 25% das hospitalizações entre pacientes que são submetidos à hemodialise nos estados Unidos e na Europa (ADIB-HAJBAGHERY *et al.*, 2012). Os principais grupos de pacientes que fazem uso dos CVCs são aqueles que apresentam insuficiência renal crônica, que é uma deterioração progressiva e irreversível da função renal, na qual fracassa a capacidade do corpo para

manter os equilíbrios metabólicos e hidroeletrolíticos, resultando em uremia ou azotemia (retenção de uréia e outros resíduos nitrogenados no sangue).

O mau funcionamento do cateter ocorre com frequência devido à formação de trombos, e tem sido a principal indicação para a sua remoção (WEISEL, 2007; DWYER, 2008; SUGITA *et al.*, 2009; KONSTANTINOU *et al.*, 2012). Os CVCs utilizados para hemodiálise em sua maioria são constituídos de orifícios laterais ao redor do segmento proximal do cateter. Os orifícios podem induzir a uma recirculação do escoamento sanguíneo e a formação de uma tensão de cisalhamento que pode favorecer a formação de fibrina e posterior desenvolvimento do trombo. A bainha de fibrina é composta por fibrinogênio, albumina, lipoproteínas e fatores de coagulação que iniciam dentro de 24 horas após a inserção do cateter (OLIVER *et al.*, 2007; PARK *et al.*, 2008; SUGITA *et al.*, 2009; LORD, 2011). A fibrina é a primeira proteína estrutural que se forma na composição do trombo e pode levar à oclusão do cateter, extravasão de líquido infundido, troca de cateter e perda de acesso secundário à trombose (WEISEL, 2007; LEE *et al.*, 2012; SCHILD, 2011).

Os trombos relacionados aos cateteres venosos centrais são induzidos inicialmente por fibrinas que se desenvolvem sobre e no interior do cateter (RAUTH *et al.*, 2008; FAINTUCH; SALAZAR, 2009; WILLICOMBE *et al.*, 2010). Os cateteres de hemodiálise tunelizados, implantados cirurgicamente no interior de uma veia central por meio de um túnel subcutâneo e um cuff de *Dracon*® próximo ao sítio de exteriorização, são de longa permanência, mas deveriam ser utilizados por limitada duração. Entretanto, os cateteres tunelizados na prática clínica de hemodiálise são utilizados como acesso permanente nos pacientes que apresentam acesso venoso inadequados para a colocação de enxertos ou fístulas artério-venosas. Os cateteres não tunelizados, inseridos percutaneamente numa veia central com o auxílio de um fio guia, não deveriam exceder duas semanas no interior da veia (SHERERTZ *et al.*, 2006; WILLICOMBE *et al.*, 2010; SCHILD, 2011).

Entretanto, na prática clínica, os CVCs não tunelizados permanencem um mínimo de dois meses no interior da veia dos pacientes. Geralmente seria o tempo necessário para a maturação da fístula artério-venosa, porém, devido às comorbidades de alguns pacientes, como diabetes, hipertensão, coagulopatias, patologias imunológicas e neurológicas, as fístulas e enxertos podem não cicatrizar e os CVCs tornam o único acesso sanguíneo durante todo o período da hemodiálise.

O aumento da tendência à formação de trombos é uma importante causa de complicações em pacientes que são submetidos à hemodiálise crônica, levando não somente à trombose no local próximo ao acesso vascular, mas também à formação de êmbolos e trombose venosa profunda (VAN ROODEN, 2009, TAL; NI, 2010; HEMMELGARN *et al.*, 2011; LEE *et al.*, 2012).

A fase de formação inicial e maturação do trombo podem propiciar a oclusão dos orifícios lateriais dos CVCs. Ambas as fases são importantes para a caracterização morfológica e histológica do tecido trombótico e da sua composição. Métodos quantitativos histológicos são importantes para quantificar as diferenças estruturais dos trombos no interior dos orifícios venosos. O desenvolvimento de específicas colorações histoquímicas e análises microscópicas fornecem detalhes e informações diferenciadas do desenvolvimento do trombo.

Considerando a estrutura tridimensional do trombo, a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) é uma das técnicas eletivas de caracterização morfológica (SILVAIN *et al.*, 2009). Entretanto, apesar do alto potencial, a MEV fornece apenas informação de camadas superficiais do trombo. Além disso, a MEV requer uma complexa preparação da amostra, incluindo procedimentos de desidratação, o que resulta em significantes modificações que deveriam ser consideradas na análise das imagens.

A microscopia de varredura a laser de dois fótons é uma técnica óptica baseada na indução de fluorescência por dois fótons de absorção, o que mostra uma alta potencialidade em caracterizar amostras biológicas em estado hidratado até várias centenas de microns de profundidade sem a necesidade de seccionar a amostra (HELMCHEN; DENK, 2005; PARK *et al.*, 2008). Recentemente tem sido aplicada em estudos de formação de trombo *in vivo* e auxiliado no tratamento trombolítico em ratos (KAMOCKA, *et al.*, 2010; KOIOKE *et al.*, 2011). A integração da MEV e da microscopia de varredura a laser de dois fótons é promissora na investigação de trombos em amostras humanas.

Além disso, a dinâmica dos fluidos computacional permite a investigação de fatores hemodinâmicos como velocidade, pressão, tensão de cisalhamento e de taxa de deformação que podem levar a uma aceleração, modulação e progressão da formação do trombo. Estudos numéricos avaliaram o desempenho e a necessidade dos orifícios laterais em cateteres angiográficos, de aspiração de trombo e em cânulas venosas (WEBER *et al.*, 2009; PENNATI *et al.*, 2010; PARK, 2012). No entanto, é desconhecido, um estudo numérico sobre a influência dos orifícios laterais no processo de formação de trombos em cateteres de hemodiálise.

Nesse sentido, apesar do uso continuado de acesso central para hemodiálise, a falta de entendimento ainda prevalece no que diz respeito ao desenvolvimento de trombos intraluminais nos CVCs. O efeito hemodinâmico do escoamento sanguíneo na modulação e estimulação no desenvolvimento da fibrina e propagação de trombo ainda requer investigação. Finalmente, o estudo micro-morfológico associado à análise do escomento sanguíneo no interior dos orifícios laterais do cateter e a predisposição à formação de trombos, ainda não tem sido bem elucidada na literatura. Dessa forma, o estudo numérico do comportamento do escomento de sanguíneo quando na presença do CVC possibilita entender a conformação da fibrina na parede do cateter, disposição e quantidades de microestruturas que constituem o trombo. Tais dados podem contribuir para a definição de novos métodos de pesquisa e protocolos de avaliação do trombo no interior dos orifícios laterais e para a implementação de estratégias de intervenção nos ambientes assistenciais de saúde.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar as estruturas micro-morfológicas do trombo venoso *in vivo* e o comportamento do escoamento venoso em presença de cateteres venosos centrais.

1.1.2 Objetivos específicos

- Criar uma geometria tridimensional das veias jugulares internas e externas, subclávias, supraescapular, cefálicas e veia cava superior;
- Criar uma geometria tridimensional dos CVCs não tunelizados;
- Simular numericamente o escoamento laminar, turbulento, transiente não-Newtoniano e newtonaino nos vasos venosos na presença e na ausência do cateter;
- Simular numericamente o escoamento laminar, turbulento transiente não-Newtoniano no interior dos cateteres venosos centrais na presença e na ausência de obstrução parcial;
- Analisar a influência da tensão de cisalhamento e da taxa de deformação na deposição e na conformação da fibrina;
- Analisar a micro-morfologia do trombo por meio da MEV e da microscopia de varredura a laser de dois fótons;
- Realizar uma análise semi-quantitativa das micro-estruturas que compõem o trombo;
- Analisar os estudos histológicos das seções do tecido trombótico, por meio de colorações histoquímicas específicas;
- Comparar a área de fibrina obtida pelo método de Carstairs com aquela obtida pela microscopia de fluorescência;
- Quantificar a área do trombo composta por fibrina por meio da visualização das seções histológicas em microscopia de fluorescência;
- Propor novos métodos de análise experimental da fibrina contida no interior do trombo *in vivo*;
- Comparar os resultados da simulação numérica com as imagens microscópicas e histológicas da fibrina no interior de alguns orifícios laterais do CVC.

2 REVISÃO BIBLIOGRÀFICA

2.1) Cateteres venosos centrais e hemostasia sanguínea

O CVC é um dispositivo de acesso venoso que pode ser de inserção percutânea por meio de uma veia central (cateteres temporários) ou implantado cirurgicamente (cateteres permanentes). A posição ideal de localização do cateter seria ao nível da junção da veia cava superior e o átrio direito. O uso de cateteres tunelizados e não tunelizados tem se tornado essencial para os pacientes que se submetem à hemodiálise (BAMBAUER *et al.*, 2011; ADIB-HAJBAGHERY *et al.*, 2012). A escolha do tipo de cateter depende das condições clínicas dos pacientes, do diagnóstico, do tipo, duração e complexidade da terapia a ser instituída e dos recursos financeiros. O cateter percutâneo temporário de duplo lúmen inserido na veia jugular interna direita tem sido o mais indicado para pacientes que fazem hemodiálise (TAL *et al.*, 2010; LEE *et al.*, 2012). De acordo com o CENSO BRASILEIRO DE DIÁLISE (2010), o percentual estimado de pacientes em hemodiálise com acesso por cateter venoso central (temporário ou permanente) foi de 14,2%, numa amostra avaliada de n= 50.128 pacientes.

Um estudo avaliou a presença de trombos, por meio de ultrassonografia, na veia jugular interna direita de pacientes que utilizavam CVC (YARDIM *et al.*, 2012). Encontrou-se uma frequência de 25% no que diz respeito à presença de trombos venosos após 10 dias de inserção do cateter de duplo lúmen (CDL) (n=45).

Os CDLs permitem o acesso vascular imediato, fornecendo fluxo sanguíneo adequado para a realização de hemodiálise em situações emergenciais como a doença renal crônica (DRC). Estes também podem ser utilizados como acesso vascular temporário em pacientes com DRC que aguardam a confecção ou maturação do acesso vascular permanente.

Os cateteres venosos centrais para hemodiálise devem atender os seguintes requerimentos: alta vazão e mínima queda de pressão durante a hemodiálise, garantir um trauma mínimo na camada íntima da parede do vaso para evitar trombos, resistência à oclusão pela bainha de fibrina, prevenir migração de bactérias, boa biocompatibilidade, radiopaco e resistência à quebra.

O processo de hemodiálise é utilizado para remover líquidos e produtos residuais urêmicos do corpo, quando o rim não consegue fazê-lo. Este tratamento é indicado para os portadores de DRC em estágio terminal. As causas principais da DRC são as enfermidades glomerulares primárias ou secundárias, em especial a nefropatia diabética, hipertensão arterial e as glomerulopatias.

Em geral, a hemodiálise é realizada três vezes por semana, em sessões com duração média de três a quatro horas e em clínicas especializadas. Uma máquina de diálise e um acesso vascular (cateter ou fístula) são necessários para conectar o sistema vascular do paciente. É iniciado com o acesso da circulação sanguínea, permitindo que o sangue do paciente seja impulsionado por meio da via arterial até o interior de um filtro (dialisador) e retorne pela via venosa estabelecendo uma circulação extracor-pórea contínua (BESABARD; PANDEY, 2011).

A vazão média preconizada que circula no interior do CVC deve ser no mínimo 300 mL/min sendo possível para alguns cateteres, o alcance de valores de 500 mL/min (BESARAB; PANDEY, 2011).Valores menores de vazão podem favorecer a recirculação e ineficiência na diálise. A pressão arterial média deve ser em torno de **-** 250 ± 10 mmHg e a pressão venosa em torno de 250 ±10 mmHg (BESARAB; PANDEY, 2011).

Valores que estão acima ou abaixo desses parâmetros podem estar associados a alguma disfunção do cateter venoso. A disfunção que ocorre devido a uma obstrução trombótica, pode ocorrer dentro de 24 horas após a inserção do cateter ou pode ocorrer depois de um tempo de permanência prolongado (BESARAB; PANDEY, 2011). Na presença de trombose, a resistência interna ao fluxo aumenta e pode ocorrer um escoamento menor que 300 mL/min e uma pressão arterial mais negativa que **-**250mmHg (BESARAB; PANDEY, 2011). Deve-se estar atento a tentativas mecânicas de manipulação do cateter, a fim de melhorar o escoamento sanguíneo devido a uma disfunção no CVC, uma vez que, tal procedimento pode causar uma perturbação do sistema fibrinolítico e promover processos inflamatórios e ativação da cascata de coagulação. (JACKSON, 2007; BESARAB; PANDEY, 2011).

Interessante comentar que, com a introdução do CVC na corrente sanguínea, proteínas plasmáticas, como o fibrinogênio, albumina, gama-globulina e o fator de Von Willebrand (vWf) aderem ao cateter, ativando as vias de coagulação intríseca e extrínseca e respostas inflamatórias (XU *et al.*, 2010; BROOS, 2011). O fibrinogênio é a proteína com maior facilidade de adesão ao material,

seguida de gama-globulina e albumina bem como fatores de coagulação (CHEN *et al.*, 2008; XU *et al.*, 2010; BROOS, 2011). O fibrinogênio se liga ao receptor contido nas membranas das plaquetas denominado integrina ((αIIbβ3) (XU *et al.*, 2010; BROOS, 2011) e pode dar início à via de coagulação intrínseca. As gama-globulinas promovem a adesão de leucócitos que dão inicio à mediação do processo inflamatório e da coagulação extrínseca.

O contato do sangue com o material polimérico representa um estímulo potencial para induzir a expressão do Fator Tecidual (FT) em neutrófilos e monócitos. Tais leucócitos, são provenientes de respostas inflamatórias, tornam-se ativados ao se ligarem à gama-globulina, expressam o FT e estimulam a via de coagulação extrínseca.

Interessante destacar que, a expressão do FT tem sido observada *in vivo* depois da inserção de enxertos de circulação extracorpórea (GOBERT *et al.*, 2004). Em tal estudo, observou que a expressão do FT em monócitos e a adesão de plaquetas ao polímero promovem a ativação das duas vias de coagulação quando na presença de um biomaterial na corrente sanguínea. Os biomaterais podem diretamente ou indiretamente contribuir para a geração de trombina (via monócito-FT) e para a remoção de plaquetas da corrente sanguínea, uma vez que, varias plaquetas também podem estar ligadas a um neutrófilo ou a um monócito (GOBERT *et al.*, 2004).

O vWf é um polímero sintetizado na região subendotelial do vaso e em megacariócitos (células da medula óssea responsáveis pela produção de plaquetas) e estimulador da adesão plaquetária, por meio de uma ponte molecular entre as plaquetas e o colágeno (RUGGERI, 2009;YUAN *et al.*, 2012). O vWf se liga ao cateter e este se liga às plaquetas por meio do receptor específico de glicoproteina (GPIbα)-vWf) contidos nas membranas das plaquetas (WU *et al.*, 2008; COSEMANS *et al.*, 2011).

Interessante comentar que, o fator XII é catalisado quando as proteínas sanguíneas entram em contato com o material polimérico. O fator XII transforma-se em fator XII a e inicía-se uma série de reações da via de coagulação intrínseca até a geração de trombina. Na via extrínseca o fator plasmático FVII se liga ao FT, tornam-se ativados (FVII a), formam um complexo TF-FVIIa e inicia-se a via de coagulação extrínseca. A FIG 2.1 apresenta um resumo esquemático das vias de coagulação extrínseca e intrínseca em presença de um biomaterial na corrente sanguínea.

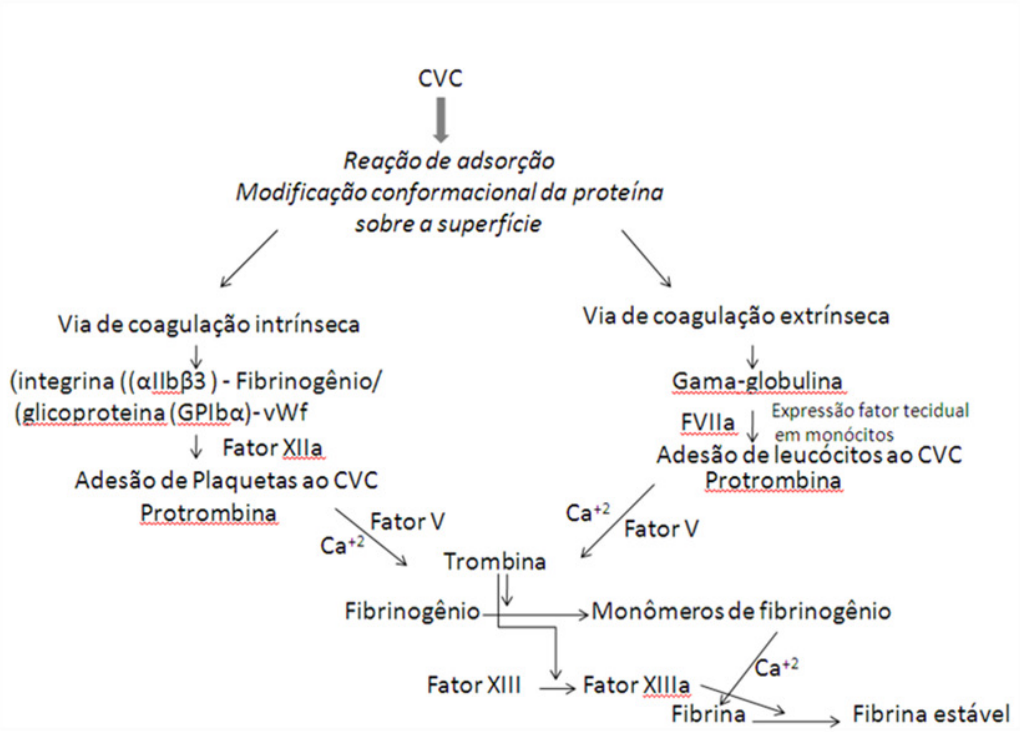


FIGURA 2.1: Resumo esquemático das vias de coagulação intrínseca e extrínseca quando na presença do CVC.

O fator de coagulação V é um fator comum de ambas as vias de coagulação e com a presença do cálcio ativa a protrombina em uma enzima denominada trombina que por sua vez ativa o fator XIII (fator estabilizador da fibrina ativada) e o fibrinogênio. O fator XIII ativado pela trombina estabiliza o coágulo, formando ligações cruzadas e polimerizadas de fibrinas insolúveis (GUYTON; HALL, 2011). Sendo assim, ambas as vias intrínseca e extrínseca são importantes quando os biomateriais interagem com a corrente sanguínea.

O processo de interação entre as proteínas do sangue e o CVC inicia com a adsorção das proteínas na superfície do material que se dá por meio de três fases: *a) transporte para a interface, b) reação de adsorção e c) modificação conformacional da proteína sobre essa superfície* (WELLINGS, 2011). As proteínas podem se ligar à superfície do material através de interação eletrostática entre os domínios das proteínas e superfícies carregadas com cargas opostas, por ligação de hidrogênio ou por interações hidrofóbicas (CHEN *et al.*, 2008; WU *et al.*, 2008). A adesão de leucócitos e plaquetas ao cateter ocorre imediatamente após a adsorção de proteínas (CHEN *et al.*, 2008; WU *et al.*, 2008).

Sendo assim, o processo de adsorção de proteínas ao polímero pode se tornar irreversível e, mesmo com a introdução de agentes fibrinolíticos, a dissolução do tecido torna-se ineficaz, devido às ligações covalentes fortes entre as proteínas plasmáticas e a parede do cateter (JACKSON, 2007; BESARAB; PANDEY, 2011). As complicações devido à formação de trombos nos orifícios laterais dos cateteres ocorrem mesmo com o uso de anticoagulantes, o que reforça a inerente trombogenicidade dos materiais poliméricos quando inseridos na corrente sanguínea.

Vale lembrar que, o plasma contém varias proteases inibidoras da cogulação como a inibidor de $\alpha_1$protease, α_2 macroglobulina, cofator II de heparina e antitrombina III (FRANZ *et al*., 2011). A antitrombina III é considerada o inibidor fisiológico mais importante, sendo capaz de neutralizar a trombina, ao formar um complexo capaz de bloquear a sua ativação. Para prevenir a formação de trombos no processo de hemodiálise, a administração de heparina é o procedimento mais comum (GOBERT *et al.*, 2004; FRANZ *et al*., 2011). A heparina se liga a antitrombina III e causa uma modificação conformacional no seu centro de ativação, acelerando a taxa de antitrombina III, mediando a inativação de várias enzimas de coagulação (trombina, FXIa, FXa e FIXa).

A heparina é incapaz de inativar a trombina ligada à fibrina ou às superfícies (GOBERT *et al.*, 2004; FRANZ *et al*., 2011). Tal fato contribui para justificar a incapacidade dos anticoagulantes em diluir as fibras de fibrina que se encontram aderias à parede interna dos orifícios lateriais dos CVCs.

Ressalta-se que, apesar de agentes trombolíticos como uroquinase ou estreptoquinase conseguirem estabelecer a patência do cateter, a fibrina e o trombo aderidos à parede interna dos orifícios dos cateteres, estão ligados covalentemente e não são removidos. Assim, sabe-se que apenas a região central do trombo, composta predominantemente por hemácias poderá ser diluída, caso seja um trombo recente, mas com limitada duração. O restabelecimento do escoamento no interior do cateter nesse caso é de duração temporária, uma vez que, rapidamente a fibrina remanescente se propaga para o centro do orifício do cateter.

Além disso, pequenas irregularidades na parede do cateter, como rugosidades das superfícies e fendas microscópicas, podem permitir maior facilidade no processo de adsorção de proteínas, adesão de plaquetas ao polímero e consequente formação inicial de bainha de fibrina (BESARAB; PANDEY, 2011).

A bainha de fibrina inicialmente é composta de fibrinogênio, albumina, lipoproteínas e fatores de coagulação (HARA *et al.*, 2012). Com o tempo a bainha de fibrina atrai as plaquetas e os fatores de coagulação e promove a aderência de leucócitos. Depois de semanas ou até meses o colágeno e músculo liso são também depositados na parede do cateter (FORAUER *et al.*, 2006). Este processo de formação de trombo varia de acordo com o tipo de paciente, herança genética e doenças de base. A formação de fibrina tem o seu início 24 horas após a inserção do cateter e, se desenvolve e se expande em toda a sua extensão num período de 5 a 7 dias (FAINTUCH; SALAZAR, 2008). O processo pode também ser iniciado com a formação de trombo pós-traumático associada com a inserção do cateter de duplo lumen temporário. A bainha de fibrina se forma no ponto de contato entre o cateter e a parede do vaso, e, quando avança ao longo de toda a sua extensão pode criar um mecanismo de valvula unidirecional (fácil de administrar solução e difícil de aspirar), com consequente diminuição do escoamento no cateter (FAINTUCH; SALAZAR, 2008; LEE *et al.*, 2012).

Em se tratando de um material polimérico em contato com a corrente sanguínea, a adsorção de proteínas à sua superfície, é ativada tanto com valores de baixa de taxa de deformação e tensão de cisalhamento, quando altos; sendo ambas intensificadoras do processo de coagulação e formação de fibrinas (COSEMANS *et al.*, 2011, LIU *et al.*, 2011).

Entende-se como tensão de cisalhamento, a força tangencial que o sangue exerce sobre a parede do vaso. A tensão de cisalhamento pode ser expressa pela EQUAÇÃO (2.1):

$$\tau = \mu \frac{du}{dy} \tag{2.1}$$

Onde τ é a tensão de cisalhamento (Pascal (Pa)), μ é a viscosidade dinâmica (Pa.s) e $\frac{du}{dy}$ é a taxa de deformação (variação da velocidade em um determinado deslocamento) (s^{-1}). Pode-se dizer que, a tensão de cisalhamento causa uma contínua taxa de deformação no fluido. E que a viscosidade representa o grau de resitência à tensão de cisalhamento.

Em condições de baixa taxa de deformação (< 300 s^{-1}) o fibrinogênio efetivamente medeia a adesão e agregação plaquetária, mas a alto valores de taxa de deformação (>1000s^{-1}) o vWf é conhecido como o ligante único que conduz a agregação e adesão de plaquetas (BROOS *et al*., 2011).

O vWf se liga ao receptor de glicoproteína das plaquetas (GPIba-vWf) e inicia agregação plaquetária. Dessa forma, a baixa taxa de deformação, a adesão é controlada pelo transporte de massa de plaquetas se a taxa de reação é muito maior que o transporte por difusão (COSEMANS *et al.*, 2011; LIU *et al.*, 2011). Devido à baixa taxa de deformação as plaquetas alcançam a superfície de forma mais lenta e a difusão convectiva domina sobre a reação cinética.

Em altos valores de tensão de cisalhamento, a adesão é controlada pela reação cinética de interação entre os receptores plaquetários e as proteínas de adesão da parede do vaso (BROOS *et al*., 2011). À medida que a taxa de deformação aumenta o transporte convectivo de plaquetas e plasma aumenta e o processo de adesão ao polímero aumenta de modo corespondente (BROOS *et al.*, 2011).

No estudo de WU *et al*. (2008) analisou-se o efeito da adsorção do vWf e do fibrinogênio no polietileno e no poliuretano *in vitro* sob variáveis condições de taxa de deformação. Observou-se que, a quantidade de proteínas adsorvidas tanto de fibrinogênio quanto de vWf aumentou com as altas da taxas de deformações ($340s^{-1}$ e $500s^{-1}$) impostas, aumentando assim a adesão plaquetária nos biomaterais (WU *et al.*, 2008).

As condições do escoamento sanguíneo podem ser quantificadas pela taxa de deformação que se refere ao gradiente de velocidade entre duas camadas laminares adjacentes de fluido (RUGGERI, 2009). Ela é zero no centro do vaso e máxima na parede. A tensão de cisalhamento é utilizada como medida do escoamento sanguíneo e é proporcional à taxa de deformação e a viscosidade do sangue (RAMBAUT; THIAGARAJAN, 2010; BROOS, 2011; WHONER *et al.*, 2012). A tensão de cisalhamento é definida como a força tangencial por unidade de área exercida na direção do escoamento.

No escoamento venoso a taxa de deformação fisiológica varia entre 20 a $200s^{-1}$ e a tensão de cisalhamento varia de 0,14 a 6,0 Pa (RAMBAUT; THIAGARAJAN, 2010; RUNENSTEIN;YIN, 2010; BROOS, 2011;WHONER *et al.*, 2012). Por outro lado, a velocidade do sangue é maior no meio do vaso e diminui gradualmente, chegando a quase zero na parede do vaso (BROOS *et al.*, 2011; WELLINGS, 2011).

O vWf é necessário para a adesão de plaquetas em situações de alta tensão de cisalhamento (BERNY *et al.*, 2010; BROOS *et al*., 2011; TOKAREV *et al.*, 2011; YUAN *et al.*, 2012; LEE *et al.*, 2012). Tanto o fibrinogênio quanto vWf são necessários para a estabilidade do trombo e agem de acordo com a taxa de deformação no sangue (TOKAREV *et al.,* 2011; KIM *et al.*, 2012; YUAN *et al.*, 2012).

Em condições de alta taxa de deformação, as plaquetas são transportadas para a superfície de adesão de uma forma muito mais rápida do que sob condições de baixa taxa de deformação. Os eritrócitos influenciam na distribuição das plaquetas no interior do vaso (BROOS *et al*., 2011). O transporte de plaquetas é guiado pela taxa de deformação do sangue em combinação com a presença de eritrócitos (BERNY *et al.*, 2010; BROOS *et al*., 2011; TOKAREV *et al.*, 2011). A ditribuição dos eritrócitos no escoamento sanguíneo não é considerada homogênea. À medida que aumenta a taxa de deformação, os eritrócitos migram em direção ao centro do vaso (BERNY *et al.*, 2010; BROOS *et al*., 2011; TOKAREV *et al.*, 2011). As plaquetas colidem com as células sanguíneas vermelhas e são transportadas para a parede do vaso. Assim, a rotação das células sanguíneas vermelhas transloca as plaquetas para a superfície do vaso. A difusão das plaquetas em resposta às células sanguíneas vermelhas pode aumentar em até três vezes de magnitude (BERNY *et al.*, 2010; BROOS *et al*., 2011; TOKAREV *et al.*, 2011). Como consequência, aumenta a concentração local de plaquetas próxima à parede do vaso, com o aumento da taxa de deformação.

Além disso, estudos *in vitro* têm mostrado que a tensões de cisalhamento maiores que 8,0 Pa estimula ligações com vWf sem nenhum envolvimento de ativadores químicos no endotélio (NESBITT *et al.*, 2009; NEEVES *et al.*, 2009). Alguns autores explicam tal fato por meio da hipótese de que a tensão de cisalhamento a 8,0 Pa apresenta força suficiente para a modificação conformacional das moléculas de vWf, expondo maiores áreas de interação entre os sítios de ligação e o receptor presente na membrana das plaquetas.

O tempo de permanência das plaquetas na camada próxima à parede é um fator importante para inicio da adesão de plaquetas e consequente formação de fibrina e trombo (NEEVES *et al.*, 2010; SHERIFF *et al.*, 2011; CHIU;CHIEN, 2011). Sendo assim, numa área de distúrbio de escoamento com diferentes valores de tensão de cisalhamento e de taxa de deformação as palquetas podem experenciar diferentes picos de redução e aumento de tensão. As plaquetas tendem a ser recrutadas numa zona de pico (aceleração) e seguem uma intensa área de agregação plaquetária dentro de uma zona de desaceleração da tensão de cisalhamento, como acontece em áreas de recirculação (NEEVES *et al.*, 2010; SHERIFF *et al.*, 2011; CHIU;CHIEN, 2011). Estudos têm demonstrado que a agregação de plaquetas ocorre preferencialmente em regiões de distúrbio de escoamento (separação de escoamento, zona de estagnação, vórtices) em que o escoamento sanguíneo passa por zonas de aceleração seguidas

por zonas de desaceleração (KAMOCKA *et al.*, 2010; NEEVES *et al*., 2010; SHERIFF *et al.*, 2011; CHIU;CHIEN, 2011,WHONER *et al*., 2012).

È interessante destacar que, numa condição em que ocorre um distúrbio no escoamento, o padrão do escoamento passa a ser não uniforme e irregular, incluindo áreas de recirculação e mudanças de direções no tempo e no espaço. Ocorre ainda um padrão de escoamento giratório, denominado vórtices em que as linhas de corrente apresentam um padrão circular no interior do vaso. Na separação do escoamento, as camadas limites se separam em direções e sentidos diferentes para formar áreas de recirculação, sendo que no ponto de separação das camadas do fluido, o gradiente de velocidade e tensão de cisalhamento pode chegar a zero.

2.2) Componentes micro-estruturais do trombo

Para análise dos componentes micro-estruturais que constituem o trombo, estudos histológicos e análises microscópicas contribuem para entender a disposição das fibrinas no interior dos orifícios laterais dos cateteres.

Um estudo histológico analisou a fibrina formada em cateteres venosos inseridos nas veias jugulares de suínos (FORAUER *et al.*, 2006). O estudo mostrou por meio da coloração de hematoxilina e eosina (H&E), uma bainha de fibrina bem formada e estruturada, com grande quantidade de colágeno, que circundava a parte externa do trombo nos cateteres com 7, 14, 30 e 45 dias de permanência. Observou-se que, em cada veia possuia uma resposta inflamatória no local de permanência do cateter, sendo que os neutrófilos (células inflamatórias agudas) foram encontrados em maior quantidade nos cateteres com 7 e 14 dias de permanência e, os monócitos (células monocíticas crônicas) foram encontrados em maior quantidade nos cateteres com 30 a 45 dias de permanência (FORAUER *et al.*, 2006).

O estudo mostrou ainda que, a fibrina desenvolvida num cateter com 7 dias de permanência era constituída por camadas de células musculares circundadas por colágeno (FORAUER *et al.*, 2006). Nos cateteres com 30 e 45 dias de permanência, a constituição da fibrina não era diferente, porém,

apresentava uma maior quantidade dessas células quando comparado a um cateter com 7 dias de permanência (FORAUER *et al.*, 2006).

Um estudo realizado em MEV e em microscopia de luz polarizada avaliou a estrutura da fibrina em coágulos de artérias coronárias (WHITTAKER; PRZYKLENK, 2009). A arquitetura da fibrina na MEV apresentou-se como fibras individualizadas, enquanto que na luz polarizada apresentaram-se como grupos de fibras semelhantes ao colágeno. Na análise histológica, a coloração de *picrosirus red*, foi utilizada para a avaliação da fibrina que, mostraram-se altamente organizadas e orientadas em paralelo (WHITTAKER; PRZYKLENK, 2009).

A fibrina por ser biorrefringente como o colágeno, foi identificada tanto na histologia quanto na microscopia de luz polarizada (WHITTAKER; PRZYKLENK, 2009). No entanto, os eritrócitos foram apenas identificados no estudo histológico por se tratar de um tecido não biorrefringente. Dessa forma, a combinação da coloração de *picrosirus red* e luz polarizada forneceram um método para a identificação de fibrina e diferenciação dos eritrócitos. Além disso, a natureza fibrosa e organizada da fibrina pode ser qualitativamente apreciada quando vista em microscopia de luz polarizada.

Estudo semi-quantitativo de MEV realizado com trombos intracoronários obtidos por tromboaspiração *in vivo*, mostrou que, as fibras de fibrina foram o principal componente do trombo, representando mais de 60% de sua composição (SILVAIN *et al.*, 2011). Plaquetas, eritrócitos, leucócitos e cristais de colesterol juntos representaram 40% da composição do trombo.

Outro estudo avaliou por meio de uma análise quantitativa em imagens de ressonância magnética, o trombo venoso *in vivo* (n=42) (BAJD *et al.*, 2012). Verificou-se que, as plaquetas estavam presentes numa média de 1 a 10% dos componentes do trombo (BAJD *et al.*, 2012).

Um estudo avaliou a trombose venosa profunda em ratos por meio da microscopia de varredura a laser de dois fótons e identificou grande quantidade de neutrófilo e monócitos esparsados sobre a massa densa e espessa de fibrina (VON BRÜHL *et al.*, 2012). Células vermelhas sanguíneas também foram visualizadas, porém em quantidade inferior aos leucócitos.

Outro estudo descritivo de MEV avaliou a fibrina formada em trombos de pacientes que tiveram infarto do miocardio (PRETORIUS *et al.*, 2011). O trombo analisado era formado por grande quantidade de malha espessa de fibras de fibrinas e escassas fibras finas de fibrinas. Adicionou-se a alguns desses trombos analisados, a trombina humana, e notou-se um aumento da espessura das fibras

de fibrinas formando placas densamente organizadas e pequenas regiões de esparsas finas fibras de fibrina formando uma malha reticulada entre as placas. Aqueles trombos em que não foi adicionada trombina apresentaram fibras espessas e placas de fibrina sem expansão das camadas de fibrina (PRETORIUS *et al.*, 2011).

De acordo com o padrão fisiológico da formação de um trombo, a trombina é uma proteína que faz a clivagem de fibrinogênio em fibrina. Assim, não somente o tipo e a localização do trombo estão relacionados com a estrutura da fibrina, mas também componentes bioquímicos como a trombina. As fibras sem trombina são densas e altamente permeáveis e não formam uma rede de fibras com aspecto de malha como quando na presença de trombina (WOLBERG *et al.*, 2008).

No que se refere às complicações causadas pela formação de trombos nos cateteres venosos, um estudo de caso realizado com oito pacientes que utilizaram o cateter de duplo lúmen temporário mostrou que, todos os pacientes apresentaram trombose venosa, trombos ao redor da ponta do cateter, incluindo trombos no atrio direito (WILLICOMBE *et al.*, 2010). Além disso, todos os pacientes apresentaram malfuncionamento do cateter, aumento da pressão arterial ou venosa durante a diálise, ou requeriu um escoamento reverso de sangue devido à diminuição excessiva do escoamento. (WILLICOMBE *et al.*, 2010). O estudo de caso mostrou ainda que, todos tiveram embolismo pulmonar resultante do descolamento de trombo (WILLICOMBE *et al.*, 2010).

Estudos indicam que, por meio da venografia observa-se que, algumas bainhas de fibrina ficam livres e não presas a nenhuma extremidade no cateter ou na parede da veia, parecendo inclinados à embolização (THOMAS; VESEL, 2003; RAUTH *et al.*, 2008; BLASKIN *et al.*, 2009; HEMMELGRAN *et al.*, 2011). Estudo prospectivo observado por venografia mostrou que 72% dos pacientes avaliados apresentaram fibrina ao redor do cateter, mantido por três semanas, e formação de trombos individuais ou em combinação (OGUZKURT *et al.*, 2004). E, 56% dos pacientes avaliados apresentaram uma grande extensão do trombo, ocluindo parcialmente a veia. Todos esses pacientes apresentaram uma diminuição da vazão durante a seção de diálise (OGUZKURT *et al.*, 2004).

A oclusão do cateter se refere à inabilidade de infundir ou de retirar líquidos dos cateteres e ocorrem em até 70% dos cateteres venosos centrais temporários de duplo lumen, devido ao trombo ou à bainha de fibrina aderida ao cateter (FAINTUCH; SALAZAR, 2008). A formação do trombo pode ocorrer no interior do lumen do cateter, a partir dos orifícios laterais, na sua superfície ou na sua ponta

distal próxima à parede dos vasos sanguíneos, o que pode limitar o tempo de duração de diálise. Técnicas inadequadas de lavagem depois da coleta de sangue podem permitir a presença de fibrina residual, acumulativa por tempo, obstruindo ou estreitando o lumen. A agregação de plaquetas e a deposição de fibrina podem encapsular completamente a superfície dos cateteres e formar um invólucro na sua ponta distal (OLIVER *et al.*, 2007; RAUTH *et al.*, 2008; BLASKIN *et al.*, 2009). Esse invólocro leva a um escoamento retrógrado do líquido infundido para dentro do cateter. Dessa forma, é importante conhecer os componentes micro-estruturais que constituem o trombo formado no interior dos orifícios dos CVCs, para a implementação de medidas efetivas de diagnóstico e tratamento do trombo e não interrupção da hemodiálise.

2.3) Influência do escoamento venoso na formação de tecido trombótico

A modificação do padrão do escoamento venoso na presença de um CVC pode modificar a tensão de cisalhamento próxima à região em que ele esta instalado, levando à propagação do trombo associado à estase, aumento da vicosidade sanguínea e até mesmo à mudança do padrão do escoamento laminar para turbulento no local em que o trombo está fixado (ABRAHAM *et al.*, 2011). Imagens histológicas e microscópicas do tecido trombótico podem facilitar o entendimento do comportamento do escoamento venoso na presença do cateter (PARA *et al.*, 2011; BAJD *et al.*, 2012).

O modo de como se comporta a tensão de cisalhamento no escoamento, por exemplo, está relacionado com a maneira de como as estruturas que compõem o tecido trombótico ficam dispostas quando vistas ao microscópio. O estudo detalhado do tecido permite analisar cada micro-estrutura que compõe o trombo de forma individualizada a fim de entender a influência do escoamento na disposição dinâmica das células. Para o estudo individualizado das estruturas, o uso de colorações químicas confere especificidade às celulas e tecidos para o entendimento detalhado de cada uma delas.

O método de Carstairs, por exemplo, foi introduzida em estudos histológicos por Carstairs em 1965 para a identificação de plaquetas e fibrinas em uma variedade de lesões trombóticas (CARSTAIRS, 1965). Atualmente esta coloração é utilizada para entender a disposição da fibrina e das plaquetas quando na formação de qualquer tipo de tecido trombótico. Estudos utilizaram a coloração de Carstairs, modificada da original, para a diferenciação de fibrina em tecidos arteriais trombóticos (THOMPSON

et al., 2009; GU *et al.*, 2010; PARA *et al.*, 2011). A coloração desses estudos foi modificada no que diz respeito ao tempo de permanência das colorações e à sua concentração, a fim de encontrar a diferenciação apropriada para o método de Cartairs, para cada tipo de tecido (THOMPSON *et al.*, 2009, GU *et al.*, 2010; PARA *et al.*, 2011).

Um estudo histológico desenvolveu *in vitro* um trombo arterial no interior de um vaso ocluído, por meio de um sistema hidrodinâmico controlável, e analisou o tecido formado pelo método de Carstairs (PARA *et al.*, 2011). O estudo por meio da dinâmica dos fluidos computacional simulou um vaso contendo uma obstrução parcial de 70% a 83% do diâmetro original. Verificou-se que, na região apical do trombo encontravam-se predominantemente plaquetas e fibrina e, na região de jusante do trombo, além da massa de plaquetas encontravam-se eritrócitos. Verificou-se ainda que, nas regiões de alta tensão de cisalhamento, regiões de estreitamento do vaso devido à oclusão, encontravam-se alto acúmulo de plaquetas. Além disso, na região de estreitamento as velocidades das plaquetas se elevaram.

Sendo assim, as imagens histológicas de trombos indicaram que as regiões de alto acúmulo de plaquetas, eram justamente aquelas com altos valores de tensão de cisalhamento (PARA *et al.*, 2011). Comprende-se com esse estudo que, se a magnitude da tensão de cisalhamento aumenta, formam-se agregados de plaquetas que tendem a não se separar quando a força é descontinuada, sugerindo que, a progressiva ativação plaquetária e altos níveis de tensão de cisalhamento levam a agregados irreversíveis.

Outro estudo numérico avaliou a modificação das condições hemodinâmicas em escoamento venoso para entender a formação de trombose venosa profunda, construindo um hipotético vaso obstruido (BAJD *et al.*, 2012). Verificou-se que, a alteração condições hemodinâmicas promoveram o crescimento de camadas de plaquetas que se propagavam ao longo do escoamento em regime laminar ($Re < 2000$) e transiente (BAJD *et al.*, 2012). Comparou-se geometrias obstruídas com varios níveis de obtrução a uma geometria não obstruida. O pico de velociade de escoamento na veia foi maior naquelas em que apresentavam obstrução ($0{,}46 \pm 0{,}04$ m/s) quando comparadas aquelas que apresentavam ausência de trombos ($0{,}16 \pm 0{,}03$ m/s) (BAJD *et al.*, 2012).

Os vetores velocidade observados no decorrer da obstrução, apresentaram uma região de alta velocidade no centro da estenose. Observou-se a presença de vórtices de baixa velocidade próximo à parede do vaso na regão distal à estenose (BAJD *et al.*, 2012). Os autores desse estudo compararam o

estudo numérico com as imgens histológicas coloridas com *Picro-Mallory* e de ressonância magnética obtidas de pacientes com trombos em veias de membros inferiores (BAJD *et al.*, 2012). Ao comparar a simulação numérica com as imagens, inferiu-se que, regiões de alta tensão de cisalhamento propiciam condições favoráveis para a ativação de plaquetas, enquanto que longos vórtices fixos após a estenose possibilita o acúmulo de plaquetas nesta região que apresentaram uma disposição e forma tal, que acompanharam o padrão do escoamento (BAJD *et al.*, 2012).

A exitência de vórtices na simulação forneceu uma possível explicação para a origem de camadas contorcidas de plaquetas observadas nas imagens de ressonância magnética e imuno-histoquimica. As estruturas do trombo como as plaquetas, fibrina e células sanguíneas vermelhas apresentaram uma disposição heterogênea no interior do trombo, e as camadas de fibrina apresentaram um arranjo não paralelo com varias camadas sobrepostas (BAJD *et al.*, 2012).

É conhecido que, a formação de trombos em regiões de baixa tensão de cisalhamento como nas veias (0,1-0,6 Pa) são frequentemente acompanhadas de instáveis condições no escoamento, como a turbulência, regiões de recirculação e áreas de estagnação que facilitam a adesão e agregação de plaquetas e hemácias (RUBENSTEIN;YIN, 2010; NEEVES *et al.*, 2010; COSEMANS *et al.*, 2011). Tal efeito pode ser ampliado com a possível mudança do perfil e padrão de escoamento sanguíneo no interior da veia quando os cateteres permanecem em seu interior. No decorrer do desenvolvimento do trombo em regiões de baixa tensão de cisalhamento como na veia, a acumulação de vórtice na parede do vaso, pode caracterizar a estrutura da fibrina primária na superfície do trombo.

Cabe destacar que, a presença de vórtices, mudanças acentuadas na direção de escoamento, expansões e pontos de estagnação favorecem o aparecimento de trombos (PAUL *et al.*, 2009). A formação de trombos é a consequência de reações bioquímicas complexas que, além de outros fatores, são determinadas pela estrutura do escoamento que ocorre no local responsável pela maior ou menor taxa de transporte das espécies químicas envolvidas (HOSKINS, 2010; BAID *et al.*, 2012). Em uma região onde ocorrem pontos de estagnação e regiões de recirculação, a difusão de reações que ativam a cascata de coagulação ocorre de forma mais eficiente, auxiliando, dessa forma, a formação de trombos.

No que diz respeito aos orifícios laterais dos cateteres venosos centrais utlizados na hemodiálise, a formação de fibrinas em seu interior, também pode ser caracterizada pela tensão de cisalhamento e áreas de recirculação nesta região. Adiciona-se a isso, a presença de plaquetas como agregados ou ade-

rente às fibras de fibrina que também dependem da hemodinâmica do escoamento sanguíneo no orifício do cateter. Além disso, a forma e a disposição das estruturas do trombo dependerão do sentido do escoamento sanguíneo na região dos orifícios laterais.

Ressalta-se que, na literatura estudos numéricos que dizem respeito ao escoamento venoso é ainda limitado e entender o comportamento do escoamento em catetres de hemodiálise ainda é um desafio para os estudos científicos. Um estudo numérico avaliou o escomento no interior de cateteres de aspiração de trombos, utlizados geralmente para remover coágulos do vaso (PENNATI *et al.*, 2010). Introduziu-se uma hipotética massa de trombo, no interior da geometria de um cilindro. A parte inicial da ponta do cateter foi inserida na massa de trombo para simular a penetração do cateter no seu interior. Compararam-se dois cateteres com diferentes desenhos das pontas distais. Um cateter possuia apenas o orifício de saída e o outro possuia três orifícios laterais adicionais. Simulou-se apenas a aspiração do escoamento nestes cateteres (PENNATI *et al.*, 2010). A ponta distal do cateter que não apresentava adicionais orifícios laterais apresentou uma resistência 25% maior à aspiração quando comparado ao cateter com orifícios.

A vazão total no cateter com orifícios laterais, no decorrer do tempo, apresentou-se maior do que o cateter que não apresentava orificios laterais. O trombo foi aspirado mais facilmente no cateter sem adicionais orifícios quando comparado com aquele com adicionais orifícios. Os orificios laterais distais, mais afastados da ponta do cateter, apresentaram valores mais altos de velocidade. Por outro lado, o escoamento que entrava no interior dos orifícios laterais causava uma deflexão nos vetores de velocidade em relação à parte inferior do cateter e como conseqüência uma zona de recirculação foi notada na jusante de cada entrada do orifício. Assim, deve-se atentar que, não somente os parâmetros hemodinâmicos do escoamento influenciam na conformação e disposição do trombo, mas também a localização dos orifícios laterais presentes nos CVCs.

2.4) Fluido não-Newtoniano e newtoniano

Um fluido não-Newtoniano é um fluido cuja viscosidade varia com o grau de deformação aplicado, assim como a duração da mesma, isto é, depende do tempo (VERSTEEG; MALALASEKERA, 2007). Nesses fluidos, a tensão de cisalhamento não é proporcional à taxa de deformação, ou seja, a viscosidade do material não é constante para uma dada situação (de temperatura e pressão). É usual designar-se a viscosidade destes fluidos por viscosidade aparente. Assim, não existe uma única equação

constitutiva para modelar os fluidos não-Newtonianos (ZENG; ZAO, 2010; O'CALLAGHANS *et al.*, 2006; LIU *et al.*, 2009). A função viscosidade deve representar o comportamento de cada fluido específico. Existem diversas expressões para a função viscosidade, que são determinadas empiricamente, de acordo com o comportamento do fluido num escoamento submetido à determinada tensão de cisalhamento.

O modelo pseudoplástico Carreau-Yassuda (C-Y), por exemplo, representa o método de iteração não linear para descrever a viscosidade dependente da taxa de deformação (WANG; BERNSDORF, 2009). O modelo Casson e Power-law também é utilizado, no entanto, o modelo Casson somente é valido para um pequeno intervalo de taxa de deformação, e a determinação da produção de tensão de cisalhamento na equação é questionavel; e as desvantagens do Power-law é que os modelos são limitados para a precisão da taxa de deformação e há uma dificuldade de prever uma viscosidade infinita (WANG; BERNSDORF, 2009). O modelo C-Y por outro lado, supera essas deficiências. Sendo assim, o modelo C-Y seria o modelo mais indicado para simular a tensão de cisalhamento e predizer a viscosidade não-Newtoniana. Este modelo pode descrever o comportamento pseudoplástico em amplas faixas de taxa de deformação levando em conta, entretanto, a complexidade dos parâmetros numéricos analisados (ASHRAFIZAADEH; BAKHSHAEI, 2009).

Um estudo que vale a pena destacar, foi realizado por SOULIS *et al*. (2008) em que se testou as limitações dos varios modelos de viscosidade não-Newtoniana, no qual são importante para a avaliação da tensão de cisalhamento e do gradiente de tensão de cisalhamento. Simulou-se a geometria intravascular da coronária esquerda com o cateter de ultrassom intracoronario no programa Fluent®. A velocidade foi assumida como uniforme, num escoamento em repouso de 0,17 m/s, moderado de 0,34 m/s e no exercício 0,68 m/s. Encontrou-se que, os modelos Power-law, Correau, Casson e C-Y tiveram comparaveis viscosidade molecular, tensão e gradiente de tensão de cisalhamento. A distribuição da tensão de cisalhamento mostrou-se constante nos vários modelos.

Encontrou-se alta viscosidade molecular e baixa tensão de cisalhamento e gradiente de tensão de cisalhamento na bifurcação principal da artéria coronária esquerda. Quando comparado ao modelo newtoniano, este apresentou boa aproximação para médias e altas taxas de deformação. No entanto, a aplicação de um modelo não-Newtoniano foi essencial para alcançar resultados aceitaveis próximos ao

real (SOULIS *et al.*, 2008). Sendo assim, o modelo não-Newtoniano explicou melhor as variáveis hemodinâmicas do escoamento sanguíneo.

No que se refere à magnitude da viscosidade molecular na região de bifurcação principal, o modelo de Power-law apresentou uma escala de 0,004 a 0,114 kg/ms, enquanto que C-Y, Coasson e o obtiveram uma faixa de 0,003 kg/ms a 0,006 kg/ms respectivamente, que são valores mais próximos dos fisiológicos normais da viscosidade sanguínea. O modelo de Power law subestimou a área média da tensão de cisalhamento fisiológica e não foi suficiente para descrever as características do sangue (SOULIS *et al.*, 2008). Por outro lado, o modelo de C-Y definiu valores aproximados das características de viscosidade sanguínea e de tensão de cisalhamento fisiológica.

Vale à pena destacar que, o sangue comporta como um pseudoplástico, isto é, o material começa a fluir tão logo uma tensão de cisalhamento seja aplicada e ocorre uma diminuição da viscosidade aparente com o aumento da tensão de cisalhamento (BROOS *et al*., 2011; WHONEER *et al.*, 2012). Não há um valor unívoco de viscosidade que pode ser considerado característico (LIU *et al.*, 2011; BROOS *et al*., 2011; WHONEER *et al.*, 2012). A viscosidade pode apenas ser calculada como a inclinação da tangente à curva em um ponto específico. Tais viscosidades são conhecidas como viscosidade aparente, obtida experimentalmente da relação entre pressão e fluxo, fixando-se as dimensões do tubo e a velocidade do escoamento, e têm significado apenas se indicarmos a velocidade de cisalhamento na qual a determinação foi feita (SOULIS *et al.*, 2009).

No entanto, em algumas condiçoes apresenta comportamento muito próximo aos líquidos newtonianos (WANG; BERNSDORF, 2009; SOULIS *et al.*, 2009). O comportamento viscoso do sangue é completamente diferente em vasos de grande calibre e em vasos da microcirculação.

Escoando em vasos de grande calibre, e em velocidades relativamente altas, o sangue se comporta como um meio contínuo. Variações na velocidade do escoamento produzem alterações muito pequenas nas viscosidades (HUANG *et al.*, 2009; GIDASPOW; HUANG, 2009; ZENG; ZHAO, 2010).

O sangue exibe um comportamento de um fluido não-Newtoniano devido ao grande número de componentes sanguíneos, principalmente os eritrócitos (WANG; BERNSDORFF, 2009; ZENG; ZHAO, 2010; LIU *et al.*, 2011). As modificações do comportamento reológico do sangue também sugerem mudanças no processo de adesão de varias espécies de proteínas nas paredes dos vasos o qual

pode induzir a formação de trombose. A viscosidade aparente varia com a concentração de células sanguíneas vermelhas e da sua distribuição espacial.

A baixa taxa de deformação ou tensão de cisalhamento a viscosidade aparente é alta, ao passo que a viscosidade aparente dimunui com o aumento da deformação e aproxima a um valor mínimo sob alta tensão de cisalhamento (WANG; BERNSDORFF, 2009; ZENG; ZHAO, 2010; LIU *et al.*, 2011).

O sangue que apresenta valores altos no hematócrito (proporção em volume de glóbulos vermelhos no sangue) exibe uma maior resistência interna quando comparado ao sangue com valores baixos no hematócrito (ZENG; ZHAO, 2010). Isso é atribuido principalmente a grande quantidade de hemácias flutuante e a sua agregação em diferentes condições de escoamento sanguíneo. Logo, a medida da viscosidade está relacionada a uma taxa de deformação específica.

A uma baixa taxa de deformação, as células sanguíneas tendem a se agregar, levando a um aumento da resistência interna, devido ao aumento da viscosidade (HUANG *et al.*, 2009; GIDASPOW; HUANG, 2009; ZENG; ZHAO, 2010). Um distúrbio no escoamento também contribui para a modificação da viscosidade, uma vez que, ocorre maior transporte de massa e maior concentração celular de elementos, como por exemplo, na presença de vórtices, maior concentração de hemácias e plaquetas está concentrada nessa região, o que aumenta a viscosidade e a resistência interna e, diminui a tensão de cisalhamento local. Dessa forma, as interações entre os componentes do sangue determinam o seu comportamento reológico.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Este capítulo foi dividido em dois subtítulos: *Estudo numérico do comportamento do escoamento venoso* desenvovido no laboratório de bioengenharia da UFMG (Labbio) e *Avaliação das estruturas micro-morfológicas do trombo* desenvolvido no *'Interdepartmental Center on Biomedical Technologies' (BIOtech)* na Universidade de Trento (Trento/Italia).

Estudo numérico do comportamento do escoamento venoso

3.1) Geração do modelo tridimencional

Para a construção dos modelos geométricos tridimensionais venosos utilizou-se imagens adquiridas do programa "*Visible Human Project®*" licenciado ao laboratório de Bioengenharia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Trata-se de um programa elaborado pela *National Library of Medicine* (NLM) nos EUA, que se propõe a criar uma base de imagens digitais de dois cadáveres, um masculino e um feminino, partindo de cortes anatômicos transversais, tomografia de raios X a fresco e congelado e de ressonância magnética. As imagens axiais anatômicas foram de 2048 pixels por 1216 pixels, onde cada pixel é definido por 24 bits. Cada imagem consistiu de 7,50 MB. 300 secções transversais com um intervalo de 1 mm foram necessários para criar a geometria total. Neste estudo, reconstruíram-se as seguintes veias do modelo masculino: jugulares internas e externas direitas e esquerdas, subclávias, supraescapular, cefálicas e veia cava superior até o inicio do átrio direito. Ressalta-se que não foi construída a extensão de todas as veias uma vez que não influenciava nos parâmetros fisiológicos da simulação. A FIG 3.1 ilustra um corte transversal com a identificação das jugulares internas delimitadas por meio de curvas polinomiais interpoladoras.

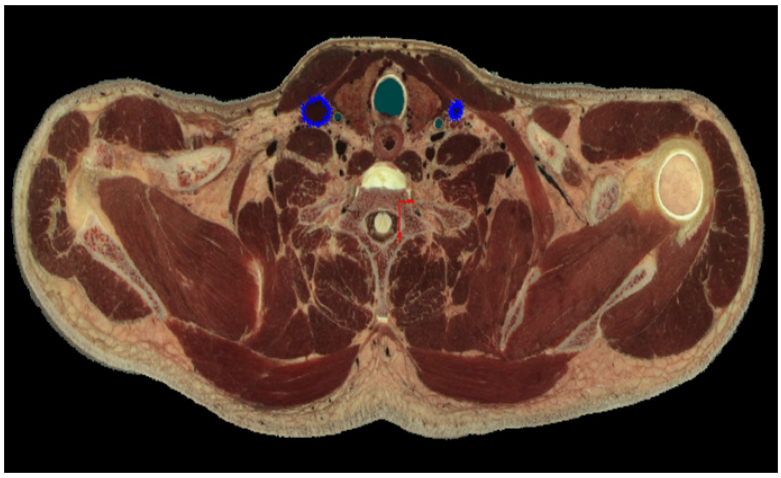


FIGURA 3.1: Identificação das veias jugulares internas na secção transversal do programa *Visible Human Project®* .

Para criar as geometrias foi necessário sobrepor as imagens dos cortes anatômicos transversais em planos paralelos no programa SolidWorks®. Criaram-se planos responsáveis pelo posicionamento das imagens, sendo que os espaçamentos entre esses representaram as distâncias físicas entre as imagens dos cortes transversais contidas no programa "*Visible Human Project®*". A FIG 3.2 mostra o posicionamento das imagens em paralelo, a geração do esboço das veias nos planos paralelos e o início da formação do sólido tridimensional das veias jugulares internas direita e esquerda.

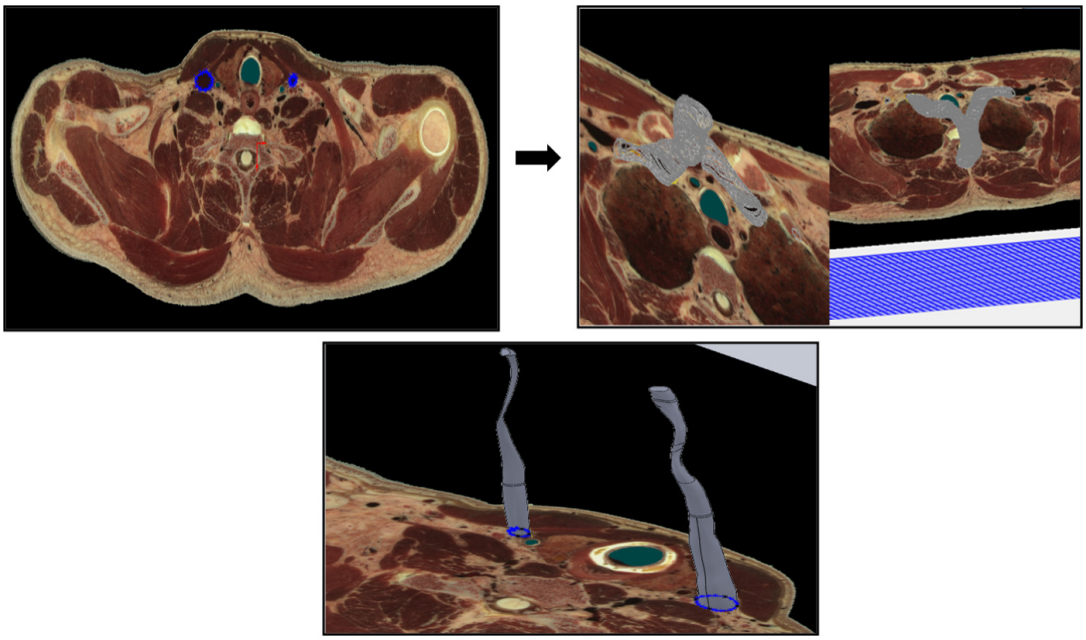


FIGURA 3.2: Curvas polinominais referentes às jugulares internas direitas e esquerdas. Posicionamento das imagens em planos paralelos e esboço do inicio das veias cava superior e braquicefalicas. Início da formação do sólido das veias jugulares internas direita e esquerda.

Os contornos criados representaram o perfil anatômico de cada veia que formaram superfícies em 2D, as quais unidas por curvas suavizadas no programa SolidWorks® possibilitaram a delimitação do perfil da trajetória venosa. Criadas as curvas representativas dos perfis venosos, essas foram enviadas para outro documento (ACIS. (sat)). O novo documento sem as imagens possibilitou uma pré-visualização das geometrias.

Para um maior detalhamento e especificação das imagens, utilizou-se a barra de ferramentas *superfície por loft* do programa SolidWorks®. Por meio de um esboço 3D e *Splines,* criaram-se linhas verticais, contornando o esboço e criando curvas guias para o ajuste de uma superfície mais suave da geometria. A FIG 3.3 apresenta a geometria venosa final gerada no programa SolidWorks® e o desenho original que encontra-se no programa *VH Dissector Pro*®.

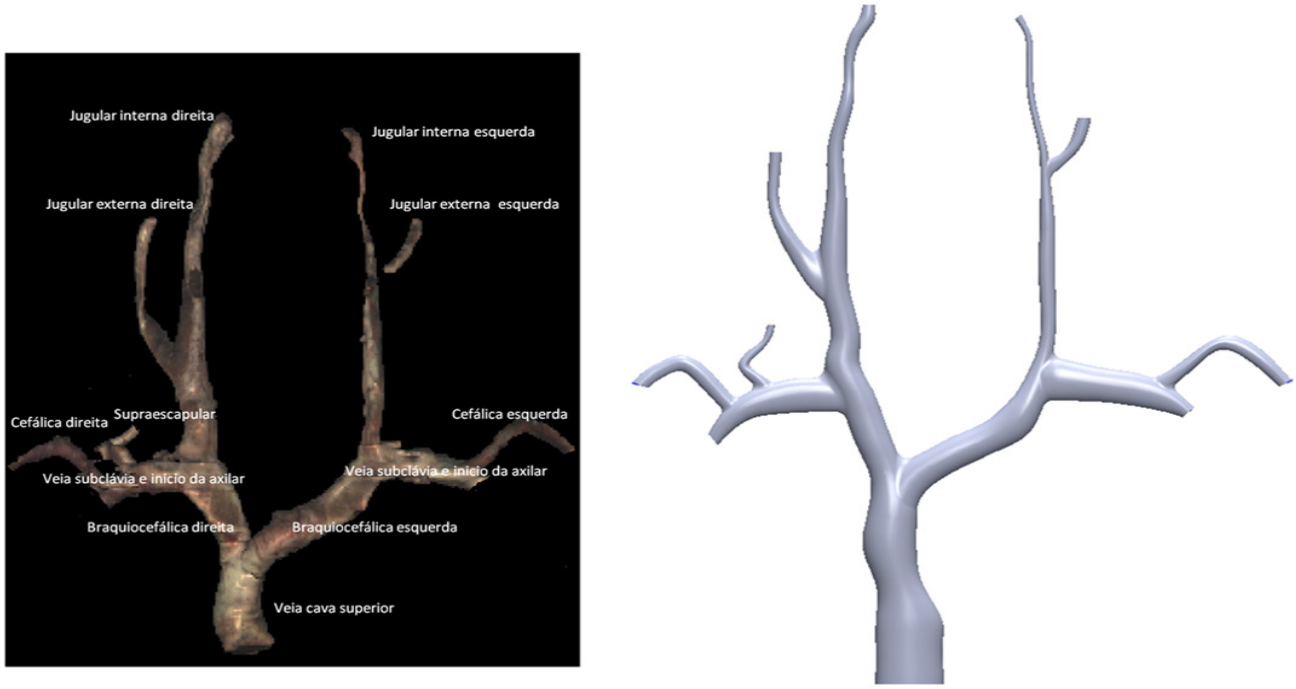


FIGURA 3.3: Geometria gerada no solidworks® comparada à original do programa *VH Dissector Pro*®.

A FIG 3.4 apresenta a geometria 3D completa da veia com e sem a inserção do cateter. A geometria da parte distal do cateter venoso não tunelizado também pode ser visualizada na FIG 3.4. O cateter foi desenhado de acordo com o fabricante Logicath™ (*Smiths Medical Deutschland Gm bH,Germany*). O cateter foi dividido em duas seções internas ao longo de sua extenção: uma via arterial em que o sangue do paciente vai em direção ao dialisador (setas cinzas) e uma via venosa (setas pretas) em que o sangue retorna para o paciente. O cateter tem 2 mm de diâmetro ao longo da cânula, 0,50 mm na ponta distal e 20 cm de comprimento. Vale lembrar que, a simulação avaliou somente o escoamento no interior da veia com a presença do cateter e não foi avaliado neste caso, o escoamento no interior do cateter.

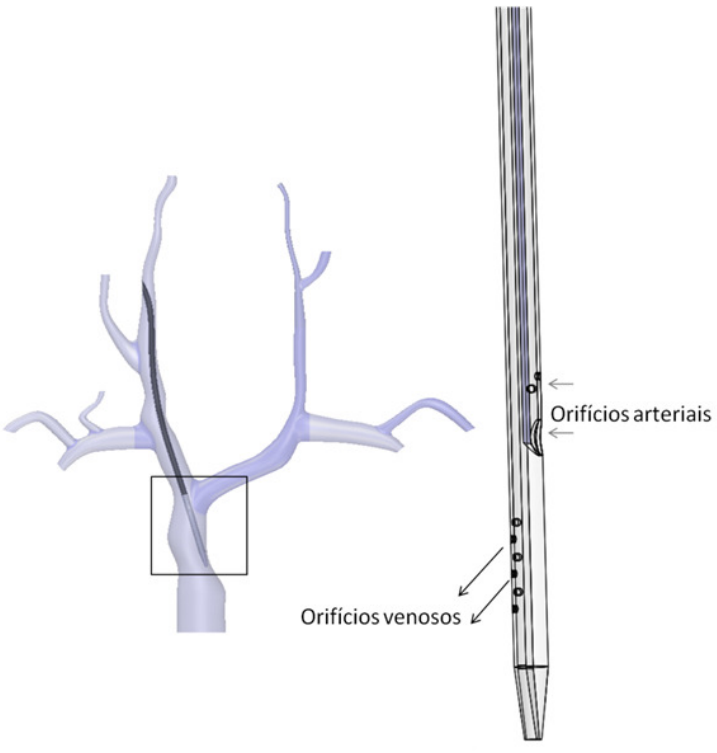


FIGURA 3.4: Geometria das veias com a presença do cateter inserido em seu interior e do CVC não tunelizado.

A FIG 3.5 apresenta um modelo realístico do CVC não tunelizado, fabricante (MedCOMP /HEMO-CATH®, Harleysville, PA, USA). A FIG 3.5 (a) apresenta o cateter desobstruído contendo três orificios venosos de saída e quatro orifícios arteriais de entrada. A FIG 3.5 (b) apresenta um cateter parcialmente obstruído.

A área do cateter sem obstrução foi de 2,93 mm tanto para o lúmen arterial quanto para o lúmen venoso. Obstruíram-se os dois primeiros orifícios venosos resultando numa área de 2,04 mm^2, isto é, uma obstrução parcial de 30% da área total. Obstruiu-se o segundo orifício arterial, resultando numa área de 1,33 mm^2, isto é, uma obstrução parcial de 55%. Dessa forma, no presente estudo, as análises computacionais fluido dinâmicas foram feitas no orifício venoso 3, no orifício central da ponta e nos orifícios arteriais 1, 3 e 4. A FIG 3.5 também apresenta a geometria tridimensional da veia que foi construída para simular o escoamento venoso na presença do cateter. Neste caso, foi avaliado o escoamento no interior do cateter e da veia.

Pode-se notar ainda na FIG 3.5(c), o corte transversal do diâmetro central do cateter sem obstrução e a FIG. 3.5 (d) o diâmetro central com a obstrução parcial no orifício venoso e arterial. Os cortes transversais foram feitos no final da extensão do cateter, local que está indicado com ‘chaves’.

O cateter que foi estudado tinha 2 mm de diâmetro, 0,5 mm de diâmetro na ponta distal e 20 cm de comprimento. Os orifícios laterais apresentaram 2,0 mm de diâmetro e o da ponta 1,2 mm de diâmetro. As imagens fotográficas com fundo vermelho apresentam um corte de 5,5 cm da ponta distal do cateter contendo os orifícios venosos e um corte de 6,0 cm contendo os orifícios arteriais.

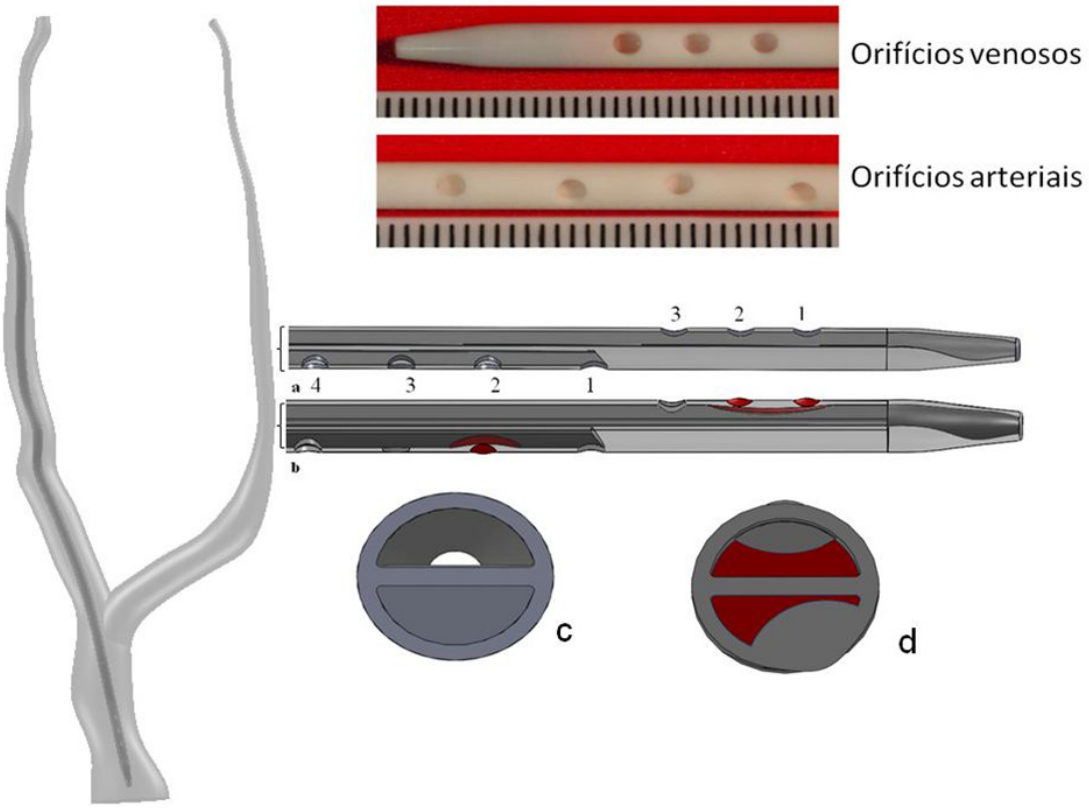


FIGURA 3.5: Geometria venosa. Cateter desobstruído (a) e obstruído (b). Os números indicam a ordem dos orificios laterais. Três orifícios venosos e quatro orifícios arteriais. Cortes transversais feitos no final da extensão do cateter, indicado com ‘chaves’ no CVC desobstruído (c) e obstruído (d). Imgens fotográficas com fundo vermelho apresentam os orifícios venosos e arteriais do CVC.

3.2) Elementos e malha

Executou-se um teste de malha dobrando o número de elementos do domínio do escoamento a partir de várias simulações, começando de uma malha menos refinada e refinando até que os resultados não mais dependessem do tamanho da malha. A velocidade, pressão e tensão de cisalhamento mostraram uma diferença máxima de 5% e em algumas partes do campo de escoamento a diferença foi < 1%. A malha original foi utilizada uma vez que, não apresentou diferenças significativas que pudesse afetar os resultados computacionais. A malha foi constituída de elementos tetraédricos e introduziram-se elementos prismáticos na parede da veia para definição de parâmetros mais precisos da tensão de cisalhamento. A FIG 3.6 mostra a malha gerada da geometria venosa contendo o cateter em seu interior.

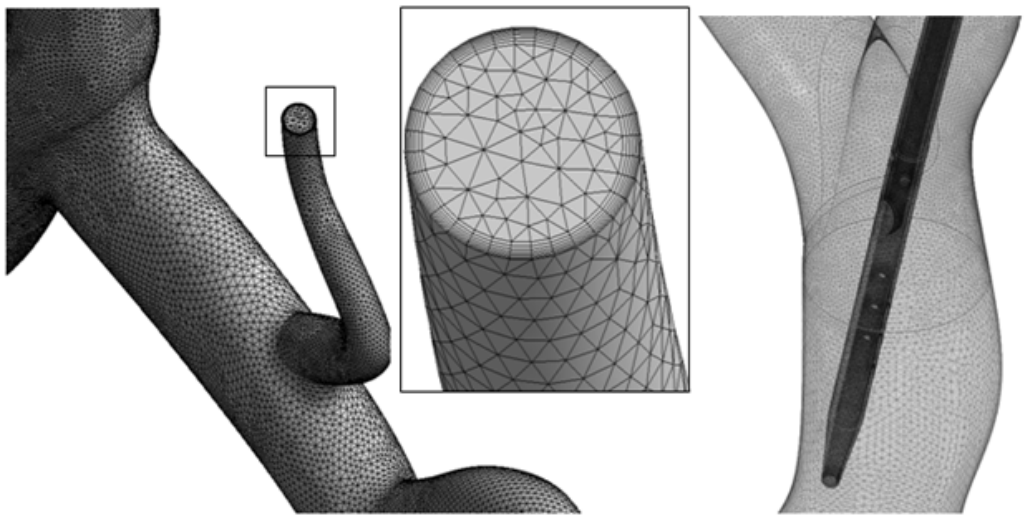


FIGURA 3.6: Malha gerada da geometria venosa e do cateter. Imagem ampliada dos elementos prismáticos próximo à parede do vaso.

Nas regiões mais estreitas da veia realizou-se um refinamento com escala de comprimento específico. Inseriu-se uma camada limite contendo oito linhas, apresentando um fator de expansão no valor de 1,2 e profundidade de 2 mm. O número total de nós da veia sem o cateter foi de 1 614549. O número de elementos tetraédricos foi cerca de 5161830 e o número total de prismas foi de 1363 516. Para a malha da veia com o cateter, o total de números de nós foi de 2179605. O número de elementos tetraédricos foi de 7408000 e o número de prismas foi de 1666286. A malha do cateter foi realizada com alta resolução perto da parede a fim de conseguir acurácia nos valores de escoamento próximo aos orifícios laterais dos cateteres.

A malha da veia em que foi realizado um estudo numérico do cateter com e sem obstrução parcial está representada na FIG 3.7.

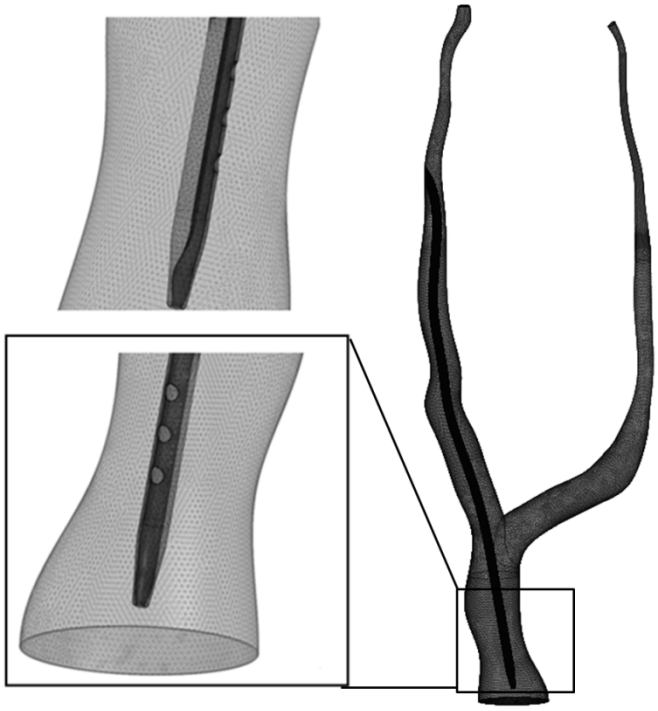


FIGURA 3.7: Malha gerada da veia e do cateter inserido em seu interior.

A malha em que se inseriu um cateter com obstrução parcial apresentou 1298000 nós. O número de elementos tetraédricos foi de 4957108 e o número de piramidais foi de 624. Inseriu-se uma

camada limite contendo oito linhas, apresentando um fator de expansão no valor de 1,15 e profundidade de 1 mm. O número de nós foi de 1303321. O número de elementos tetraédricos foi de 4989650 e o número de piramidais foi de 1081.

3.3) Condições de contorno e simulação numérica

Para a obtenção de campos de velocidade e pressão no volume de controle, utilizou-se, a dinâmica dos fluidos computacional (CFD) que é baseada em computador para simular o comportamento dos sistemas envolvendo escoamento de fluido, transferência de calor bem como outros processos físicos. O programa trabalha resolvendo equações de Navier-Stokes sobre um determinado domínio de interesse e suas condições de contorno.

O Método de Volumes Finitos (MVF) é o princípio de conservação de uma determinada quantidade física expressa pelas equações governantes sobre qualquer volume finito, também denominado volume de controle (VERSTEEG; MALALASEKERA, 2007). O domínio do escoamento é discretizado em um conjunto de volumes de controle não sobrepostos, que podem ser irregulares no tamanho e na forma.

O MVF utiliza como ponto de partida a forma integral da equação da conservação. O domínio de solução é dividido num número finito de volumes de controle contíguos, e a equação da conservação é aplicada a cada volume de controle. No centróide de cada volume de controle localiza-se um nó computacional, no qual são calculados os valores das variáveis (VERSTEEG; MALALASEKERA, 2007). Tais valores nas superfícies dos volumes de controle são obtidos por interpolação em função dos valores nodais. Os integrais de volume e de superfície são aproximados usando fórmulas de quadratura apropriadas. Como resultado, obtém-se uma equação algébrica para cada volume de controle.

O algoritimo numérico do MVF consiste em:

1. Integração formal das equações governantes do escoamento do fluido sobre todos os volumes de controle do domínio de solução;

2. Discretização que envolve a substituição de uma variedade de aproximações do tipo de diferenças finitas por termos nas equações integradas representando o processo de escoamento tais como

convecção, difusão e termo fonte. O processo converge as equações integrais num sistema de equações algébricas;

3. Solução de equações algébricas por método iterativo.

O programa ANSYS-CFX® 12.1 (ANSYS-Fluent Inc., Lebanon, NH, USA) foi utilizado para obter equanções de Navier-Stokes em escoamentos transientes e incomprenssíveis com o pressuposto de que a parede do vaso é rígida. Isto é, não foram feitas simulações estruturais dos movimentos de contração e relaxamento da parede dos vasos venosos durante o ciclo cardíaco.

O programa dispõe de recursos para discretizar o domínio em vários volumes, ou seja, permite a definição da malha a ser utilizada na simulação. O programa é constituído por três módulos, o primeiro de pré-processamento, o segundo é o módulo de processamento e o último é o de pós-processamento. O módulo de pré-processamento é responsável pela definição de todos os parâmetros físicos associados ao domínio físico, ou seja, no módulo de pré-processamento são definidas as características do fluido, das equações que representam o escoamento e das condições de contorno. O pré-processador permite grande flexibilidade na implementação dessas, seja através de funções criadas no próprio pré-processador ou através de subrotinas em linguagem de programação FORTRAN. Definida as condições de simulação procede-se com a solução das equações que descrevem o escoamento. Essa etapa é realizada pelo processador. Terminada a fase de processamento segue-se para a análise dos resultados que é efetuada por meio do módulo de pós-processamento.

As equações de Navier-Stokes de continuidade e de momento dependente do tempo para escoamento incomprensivel e laminar estão apresentadas nas EQUAÇÕES (3.1) e (3.2) respectivamente

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} + \nabla . (\rho \boldsymbol{U}) = 0 \tag{3.1}$$

$$\frac{\partial (\rho \boldsymbol{U})}{\partial \mathrm{t}} + \frac{\partial}{\partial \mathrm{x_i}} \left(\rho \mathbf{U_i}\, \mathbf{U_j} \right) = -\nabla \mathrm{p} + \nabla . \tau + \mathrm{S_M} \tag{3.2}$$

Onde o tensor tensão τ esta relacionado com a taxa de deformação por,

$$\tau = \mu (\nabla \mathbf{U} + \nabla \mathbf{U}^{T}) \quad (3.3)$$

Onde μ é a viscosidade, U= (u_1, u_2, u_3) o vetor velocidade do escoamento, p é a pressão interna e ρ a densidade. O valor de densidade foi de ρ = 1050 kg/m^3 e de viscosidade dinâmica do sangue foi de $\mu = 3{,}5\times10^{-3}$ Pa.s para o calculo de escoamento newtoniano.

Quanto ao modelo de turbulência, optou-se por utilizar o modelo k-ω *Shear Stress Tansport (SST),* num escoamento transiente e incompressível. Esse modelo é o mais adequado para prever a variação da tensão de cisalhamento nessa região e possui alta acurácia em modelos de simulação de camada limite (VERSTEEG; MALALASEKERA, 2007). O modelo k-ω SST superou as limitações do modelo k-ω original possibilitando uma melhor acurácia nas condições de entrada e na quantidade de separação de escoamento em gradientes de pressão adverso, pela inclusão dos efeitos de transporte dentro da formulação vórtice-viscosidade (ANSYS CFX 12/TUTORIAL). Os modelos de turbulência são métodos semi-empíricos e as equações de conservação de momento linear, fornecem o comportamento médio do escoamento.

As constantes deste modelo estão apresentadas no QUADRO (3.1):

QUADRO 3.1

Distribuição das constantes do modelo k-ω *Shear Stress Tansport (SST)*

σ_k	$\sigma_{\omega,1}$	$\sigma_{\omega,2}$	γ_2	β_2	β^*
1,0	2,0	1,17	0,44	0,083	0,09

Para o escoamento turbulento a equação turbulenta de médias de Reynolds (*Reynolds-averaged Navier–Stokes equation* (RANS)) foi representada pela EQUAÇÃO (3.4). As equações de RANS são obtidas por meio de um conjunto de médias das equações de Navier-Stokes e da continuidade. O elemento crítico da modelagem RANS é a representação das tensões de Reynolds ou tensões turbulentas que descrevem os efeitos das flutuações turbulentas de pressão e velocidade.

$$\frac{\partial \mathbf{U}_i}{\partial t}\frac{\partial}{\partial x_j}(\rho \mathbf{U}_i \mathbf{U}_j) = -\frac{\partial \rho}{\partial x_i} + \frac{\partial y}{\partial x_j}\left(\tau_{ij} - \rho\,\overline{x u_i u_j}\right) + S_M \quad (3.4)$$

A solução das EQUAÇÕES (3.5) e (3.6) alcança os valores de energia cinética turbulenta κ, e a taxa de dissipação especifica ω no modelo SST e são dadas por:

$$\frac{\partial(\rho u_i k)}{\partial x_i} = \gamma . P_{k-\beta_1} \rho k\omega + \frac{\partial}{\partial x_i}\left[\left(\mu + \frac{\mu_{turb}}{\alpha_k}\right)\frac{\partial k}{\partial x_i}\right], \quad (3.5)$$

$$\frac{\partial(\rho u_i \omega)}{\partial x_i} = \mu A \rho S^2 - \beta_2 \rho \omega^2 + \frac{\partial}{\partial x_i}\left[\left(\mu + \frac{\mu_{turb}}{\alpha_k}\right)\frac{\partial \omega}{\partial x_i}\right] + 2(1 - F_1)\rho \frac{1}{\sigma\omega_2\, \omega}\frac{\partial k}{\partial x_i}\frac{\partial \omega}{\partial x_i} \quad (3.6)$$

A viscosidade turbulenta é dada por:

$$\mu_{turb} = \frac{a_1\, k}{\max(a_1 \omega, SF_2)} \quad (3.7)$$

Onde F_1 e F_2 é uma função de mistura no modelo SST, P termo de produção do modelo de trurbulência, S é valor absoluto de tensão de deformação, u_i velocidade local, x_i tensor de direção das coordenadas, $\beta_1\beta_2$ são constantes do modelo SST, σ difusividade de Prandtl, γ intermitência. Para o cálculo da viscosidade não-Newtoniana o modelo C-Y foi adotado.

A equação do modelo é representada como:

$$\frac{\mu - \mu_\infty}{\mu_0 - \mu_\infty} = (1 + (\lambda\, \dot{\gamma})^a\ )^{(n-1)/a} \quad (3.8)$$

Onde Onde μ_0 e μ_∞ são as viscosidades dinâmicas na taxa de deformação 0 e ∞, $\dot{\gamma}$ é a taxa de deformação, λ tempo viscoelastico característico do fluido. Na taxa de cisalhamento crítica 1/λ a viscosidade começa a decrescer. Os parâmetros a e n são indexados do modelamento Power law e podem ser determinados a partir de dados experimentais. n é uma medida do desvio do fluido newtoniano (indice de Power law). Quando é $n < 1$ os fluidos são denominados pseudoplásticos, uma vez que a viscosidade aparente diminui com a taxa de deformação crescente (tornam-se delgados com tensões tangenciais).

Foram aplicados no presente estudo, os seguintes parâmetros para o escoamento sanguíneo não-Newtoniano (WANG; BERNSDORFF, 2009, LIU *et al.*, 2011):

$$\mu_0=56 \times 10^{-3} \text{ Pa.s},\ \mu_\infty= 3.45 \times 10^{-3} \text{ Pa.s},\ a=1.25,\ n=0.22,\ \lambda=1.1902 \text{ s}$$

Para avaliar a taxa de deformação escalar ($\dot{\gamma}$) utilizou-se a EQUAÇÃO (3.9) a definição

$$\dot{\gamma} = 2\sqrt{D_{II}} \tag{3.9}$$

Onde D_{II} denota o segundo invariante do tensor taxa de deformação D = (1/2) ($\nabla\upsilon + (\nabla\upsilon)^T$). O segundo invariante pode ser expresso D_{II} para um escoamento incompressível, trD =0, como mostra a EQUAÇÃO (3.10)

$$D_{II} = \frac{1tr\mathrm{D}^2}{2} = \frac{1}{2}\, d_{ij}d_{ij}, \tag{3.10}$$

Onde d_{ij} são components do tensor taxa de deformação *D* dado pela equação.

$$d_{ij} = \frac{1}{2}\left(\frac{\partial v_i}{\partial_{yj}} + \frac{\partial v_i}{\partial_{yi}}\right), i,j = 1,2,3 \tag{3.11}$$

A duração do ciclo cardíaco foi assumida como 0,8s alcançando uma taxa de batimento cardíaco de 75 batidas por minuto. O período de tempo para a sístole e a diástole foram 50% do ciclo cardíaco. O método de Euler de segunda ordem, *backward*, foi utilizado como integração do tempo.

Quanto ao passo de tempo, empregou-se Δt = 0,0005 s com 1600 passos de tempo total por ciclo cardíaco. Este passo de tempo forneceu um numero de Courant menor que 1 no domínio do escoamento, garantindo resultados mais precisos em cada passo de tempo.

Para o alcance desse passo de tempo, dobraram-se diversos valores de passos de tempos e nenhuma diferença significativa foi observado no escomento das veias. A convergência máxima residual foi de 1×10^{-4} foi definida manualmente para controlar a precisão da solução de relevância fisiológica e, aproximadamente 1-5 interações foram necessárias para alcançar a convergência em cada passo de tempo. Utilizaram-se três processadores *Intel Pentium dual-core* 2.80 GHz 4GB de RAM, três processadores *Intel Xeon Quad Core* 2.67GHz 16 GB de RAM e um *dual-core Intel Xeon* 1.60 GHz 8GB de RAM, totalizando 25 unidades de processamento.

Fez-se uma curva polinominal para as condições de contorno de entrada e saída, no programa MATLAB versão 7.4 (The Mathworks Inc.; Natick, MA, USA), por meio de interpolação cúbica. Nas entradas das veias assumiu-se um perfil de velocidade uniforme no decorrer do tempo de acordo com a média da velocidade da sístole e diástole de cada tipo de veia. As curvas polinominais foram uma aproximação das curvas encontradas na literatura e nas linhas obtidas em utrassonografia venosa de doppler colorido (ROSALES *et al.*, 2009; LIN *et al.*, 2009; MEIR *et al.*, 2009; ABURAHAMA; BANDYK, 2013). Os escoamentos venosos diastólicos e sistólicos são descritos em seu retorno cardíaco em direção ao átrio direito. As curvas representaram o pulso de velocidade nas veias jugulares internas direitas e de pressão no átrio no decorrer do ciclo cardíaco. Sendo assim, são correspondentes.

A velocidade de entrada apresentou um padrão bifásico no inteior da veia, sendo a curva da sístole (indicado pela letra S) ventricular dominante quando comparada a menor curva da diástole (indicado pela letra D) ventricular (GRA 3.1 e 3.2).

Considerou-se neste estudo, a descrição do ciclo cardíaco na sístole e na diástole ventricular direita, uma vez que, é importante observar a propagação do pulso cardíaco direito para as demais veias que foram construídas neste estudo para as condições de contorno da simulação.

Durante a sístole atrial, isto é, contração atrial (indicado pela letra A), ocorre aumento da pressão atrial e o enchimento final dos ventrículos. Ao mesmo tempo, o sangue é propelido de forma retrógrada para a veia cava e ocorre um escoamento reverso na curva de velocidade das veias jugulares internas direita e esquerda (observado abaixo da linha de base do gráfico). A seguir ocorre a contração isovolumétrica, período no qual, ocorre a contração do ventrículo direito e aumento da pressão. O volume ventricular, permanence constante visto que as válvulas estão fechadas. Durante a sístole (S), a válvula tricúspede se fecha e a pressão no átrio diminui enquanto que a pressão no ventrículo aumenta até a ejeção ventricular rápida, fase na qual, o volume ventricular diminui de forma acentuada. Inicia-se então, o enchimento atrial com o aumento de pressão à medida que o sangue retorna para o átrio direito. A pressão cresce até o sobreenchimento do átrio contra a vavula tricúspede (indicada pela letra V) anteriormente a sua abertura. A seguir ocorre uma queda de pressão no átrio devido à abertura da válvula tricúspede, ocorrendo a fase de diástole (D) ventricular em que o sangue é propelido para o ventrículo direito. Os GRAs. 3.1 e 3.2 apresentam as condições de contorno da velocidade no interior das veias jugulares internas direita e esquerda e da pressão no átrio direito.

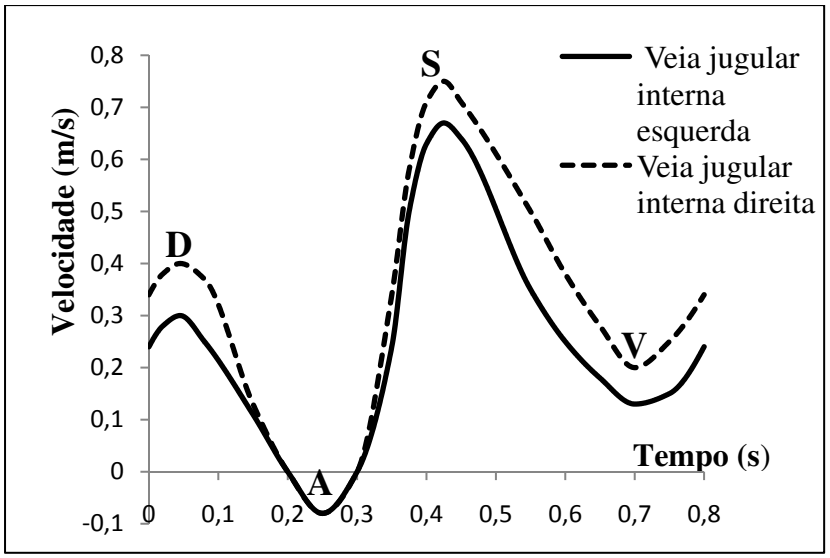


GRÁFICO 3.1: Condições de contorno para a veia no escoamento transiente. Perfil da curva de velocidade de entrada nas veias jugulares internas direita e esquerda. S corresponde à sístole, D corresponde à diástole, A corresponde à contração do átrio e V representa a curva de transição do sobreenchimento do átrio contra a vávula tricúspede.

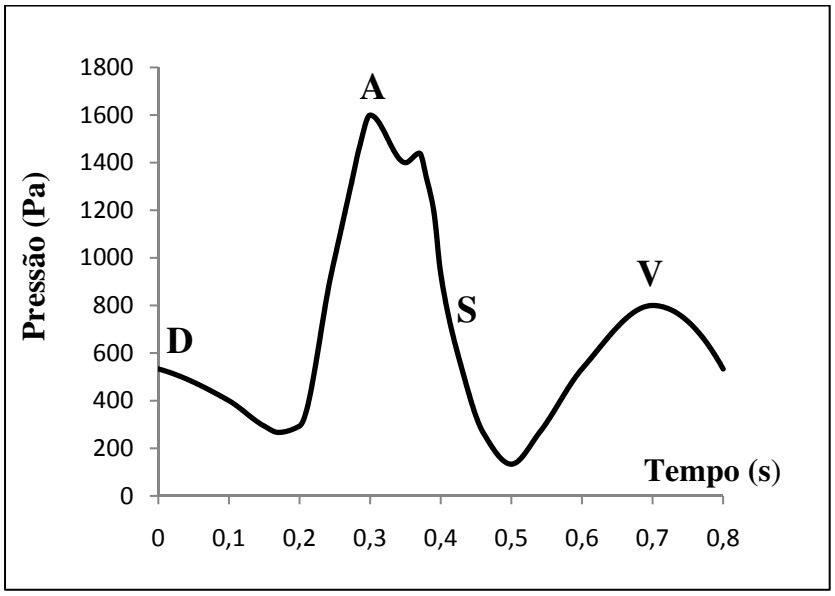


GRÁFICO 3.2: Condições de contorno para a veia no escoamento transiente. Perfil da pressão de saída no átrio direito. S corresponde à sístole, D corresponde à diástole, A corresponde à contração do átrio e V representa a curva de transição do sobreenchimento do átrio contra a vávula tricúspede.

O GRA 3.3 apresenta as curvas de variação da velocidade em todas as veias do presente estudo. As curvas foram utilizadas como condições de contorno da simulação em que o cateter não apresentou escoamento em seu interior.

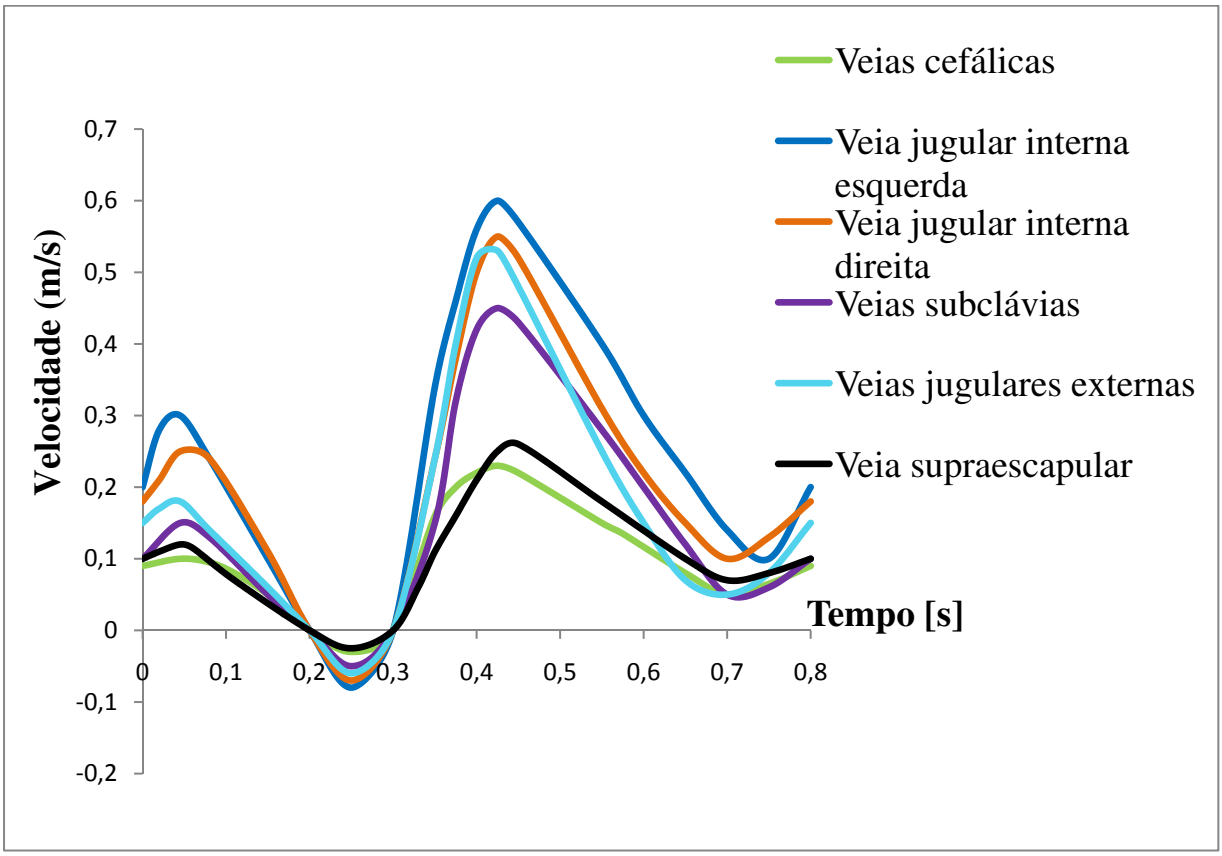


GRÁFICO 3.3: Distribuição do perfil de velocidade das veias consideradas como condições de contorno de entrada.

O modelo numérico foi inicialmente configurado com um escoamento permanente com uma velocidade de entrada de 0,2 m/s para a veia jugular interna esquerda, 0,18 m/s para a jugular interna direita, 0,12m/s para as veias subclavias, 0,15 m/s para as veias jugulares externas, 0,10 m/s para a veia supraescapular e 0,9 m/s para as veias cefálicas. A pressão de saída foi de 533,28 Pa. A condição imposta ao longo da parede foi de não deslizamento.

Quanto às condições de contorno no interior do cateter, inseriu-se uma vazão mássica de 0,00525 kg s^{-1} de entrada venosa (correspondente a uma vazão de 300 mL/min) e uma pressão na

saída arterial do CVC de **-** 250 mmHg. Os resultados obtidos para os cálculos da simulação permanente foram impostos como condições iniciais para o escoamento transiente.

O critério utilizado para determinar o regime laminar ou turbulento foi pelo número de Reynolds, $Re = \rho VL/\mu$. Onde ρ e μ são a densidade e viscosidade dinâmica e V e L são a velocidade e o comprimento típicos do escoamento. Sendo que L é o diâmetro hidráulico.

$$D_h = \frac{4A}{P} \tag{3.12}$$

A é a area da seção transversal, *P* é o perímetro molhado, isto é, o comprimento de parede em contato com o fluido escoando em qualquer seção transversal. O fator 4 é introduzido para que o diâmetro hidráulico seja igual ao diâmetro da seção circular. O regime foi considerado laminar quando Re < 2000 e turbulento com Re > 3000 (ABRAHAM *et al.*, 2011). As variáveis contínuas foram expressas em Média±DP ou em Medianas (Mínimo-Máximo).

A área na região entre a veia cava superior e inicio do átrio direito foi de 0,0005 m^2, e o perimetro foi de 0,0792 m. No que se refere ao segmento venoso e arterial do cateter, a área sem obstrução foi de 2,93 $x10^{-6}$ m^2 e o perímetro de 0,0071 m. A área do cateter com obstrução venosa foi de 2,04 $x10^{-6}$ m^2 e o perímetro foi de 0,0071 m. A área de obstrução arterial foi de 1,33 $x10^{-6}$ m^2 e o perímetro foi de 0,0071 m.

Avaliação das estruturas micro-morfológicas

3.4) Coleta de dados:

A coleta de dados ocorreu no período de agosto de 2011 a Julho de 2012 no departamento de Nefrologia do hospital "*Santa Chiara*" de Trento/Italia durante um estudo prospectivo observacional. O estudo foi aprovado pelo comitê de ética "*Comitato etico per le sperimentazioni cliniche" della Azienda Provinciale per i servizi sanitari*/Trento/Italia, processo número 04/2010 (ANEXO A). Este estudo foi parte de um projeto de pesquisa denominado "*Papel da modificação de biofilme e do dispositivo venoso central na prevenção de infecções"*. O projeto foi financiado pela província autonoma de Trento em 2008 e pela "*Fondazione Cassa di Risparmio di Trento e Rovereto/Italia*''.

Um formulário de coleta de dados contendo informações essenciais sobre o paciente foi preenchido pelo nefrologista no momento de retirada do cateter (ANEXO B). O formulário continha as seguintes variaveis: idade, sexo, data de nascimento, modelo do cateter, local de inserção, dados de PT (Tempo de trombina), PTT (tempo parcial de tromboplastina) e plaquetas na inserção e retirada do cateter, data de inserção e retirada do cateter, causa da retirada, terapia anticoagulante e quantas vezes na semana os pacientes faziam a hemodiálise.

Fez-se uma analise estatística no programa *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS) versão 19.0 e no *GraphPad Prism*® 5.0.

Avaliou-se a normalidade das variáveis pelo teste de Shapiro-Wilk e se distribuíam normalmente com o valor de $p>0,05$. Fez-se a correlação de Spearman para as variáveis que não foram distribuídas normalmente. Fez-se uma análise não paramétrica com a utilização de mediana e interquartil (25-75%) e o teste de Mann-Whitney U. Para as variáveis que se distribuíram normalmente fez-se a correlação de Pearson e uma análise paramétrica com a utilização de Média±DP e teste t não pareado.

3.5) Preparo e armazenamento do material

Todos os CVCs foram lavados com solução fisiológica a 9% e fixados com formaldeído tamponado a 4% imediatamente após a retirada do paciente. Uma documentação fotográfica foi realizada nas secções distais dos cateteres (corte de 10 cm) após um período de no mínimo 48 horas de fixação.

Os três orifícios laterais venosos completamente ocluídos pelo trombo foram considerados para análise em MEV e Microscopia de varredura a laser de dois fótons. Dois segmentos de aproximadamente 5 mm de extensão cada, foram isolados e seccionados do cateter por um bisturi como mostra a FIG 3.8. As linhas tracejadas indicam o ponto de corte para obter as amostras da MEV (amostra do lado direito) e Microscopia de varredura a laser de dois fótons (amostra do lado esquerdo). A grade menor é de 1 mm na FIG 3.8. As duas amostras foram então sujeitas a específicos protocolos que serão detalhados a seguir.

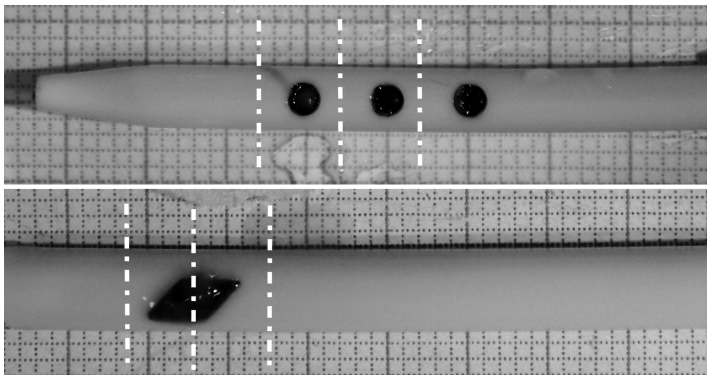


FIGURA 3.8: Orifícios venosos ocluídos por trombos. Cateter não tunelizado no topo e tunelizado na parte inferior. Linhas tracejadas indicam o ponto de corte das amostras obtidas para as micrsocopias. Menor grade de 1mm.

No que diz respeito às amostras para os estudos histológicos, os segmentos foram cortados em duas metades através de duas secções transversais no centro do segmento por meio de um bisturi (FIG 3.9). O procedimento dispôs de duas amostras equivalentes para a caracterização histológica. O segmento foi retirado do mesmo cateter em que foram selecionadas as outras amostras de MEV e Microscopia de varredura a laser de dois fótons.

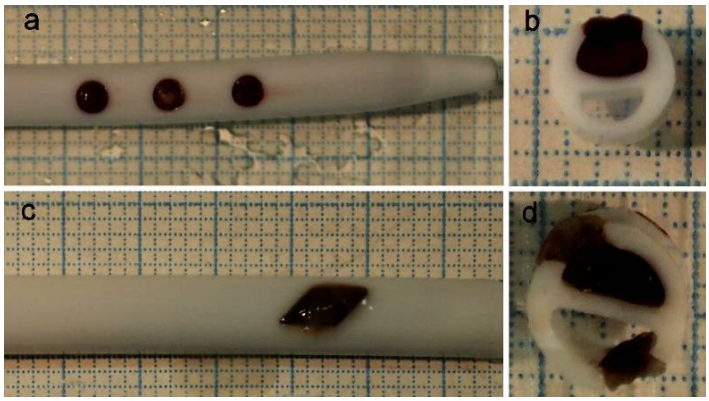


FIGURA 3.9: Cateter não tunelizado com trombo nos orifícios venoso (a). Secção transversal do cateter não tunelizado (b). Cateteter tunelizado com orifício lateral ocluído (c). Secção transversal do cateter tunelizado (d).

3.6) Protocolo MEV

Um total de 29 cateteres CVC (24 não tunelizados, MedCOMP/HEMO-CATH®, Harleysville, PA, USA e 5 tunelizados, Palindrome ™, Mansfield, MA, USA) foram coletados de pacientes (idade média de 62 (35-84) anos; masculino:feminino 21:8; mediana de inserção de tempo 17 (5-150) dias para não tunelizados e 151 (37-1080) para tunelizados.

O princípio da MEV consiste na emissão de um feixe de elétrons por um filamento de tungstênio, que é concentrado, controlado e reduzido por um sistema de lentes eletromagnéticas, diafragmas e bobinas, conforme incide sobre a amostra (BOGNER *et al.*, 2007). Consequentemente leva a uma série de emissões de sinais relacionados com a interação do feixe de elétrons incidente e a amostra. Os sinais emitidos encontram-se sob a forma de elétrons (secundários, retroespalhados, absorvidos, transmitidos, difratados, etc.) e de fótons (fotoluminescentes e raios-X), os quais são captados por detectores apropriados, sendo amplificados e processados num sistema analisador específico para cada tipo de sinal (STADTLÄNDER, 2007).

No presente estudo, utlizou-se um detector de elétrons secundários. Nesse detector, o feixe de elétrons ao focalizar um ponto da amostra gera sinais que são captados e amplificados fornecendo um sinal elétrico que gera a imagem. Conforme o feixe varre a área em análise, uma imagem virtual vai sendo formada ponto a ponto.

Para a garantia do livre caminho médio dos elétrons, é necessário um sistema de alto vácuo (933-1333 Pa) nas partes que compõem o equipamento (STADTLÄNDER, 2007).Os elétrons secundários geram da superfície da amostra (profundidade de 5 a 10 nm) e levam informações da superfície topográfica do material. Quando o feixe de elétrons primários de alta energia atinge a amostra produz colisões entre os elétrons e átomos que podem ser elástica e inelástica (BOGNER *et al.*, 2007; STADTLÄNDER, 2007). Os elétrons secundários são provenientes das colisões inelásticas do feixe primário com a amostra e é o resultado da interação entre elétrons fornecendo assim baixa energia (BOGNER *et al.*, 2007; STADTLÄNDER, 2007).

Nessas colisões inelásticas os elétrons do feixe perdem energia que é transferida para os elétrons da amostra que, em se tratando de elétrons das últimas camadas (fracamente ligados ao núcleo)

podem ser removidos do átomo e passarem a se movimentar através do material (BOGNER *et al.*, 2007; STADTLÄNDER, 2007). Quando esses elétrons são removidos próximos à superfície podem ser ejetados da amostra, sendo os demais absorvidos pelos átomos adjacentes. Normalmente esses são elétrons de baixa energia (< 15 eV) por causa disso a sua origem está próxima à superfície (profundidade de 5 a 10 nm). Esses elétrons são essenciais para trabalhar com amostras biológicas sem destruição do campo de amostra. Neste estudo, a energia do feixe de elétrons utlizada foi de 1,0 KV e a distância entre o objetivo da coluna do microscópio eletrônico e a superfície da amostra foi de 10 mm.

No que diz respeito ao preparo da amostra para a análise em MEV, após a fixação em formaldeído tamponado a 4% as amostras foram lavadas em tampão fosfato e armazenado em etanol 70% até o dia da observação em MEV. Os segmentos de cateteres foram desidratados em soluções ascendentes de hidro-alcools (70%, 90% e 100%). Em cada solução de etanol a amostra permaneceu imersa num período de uma hora. As amostras permaneceram por 24 horas numa cabine de fluxo laminar para secagem.

A montagem foi feita num suporte de amostras contendo fita de carbono dupla-face condutora para fixação dos segmentos de cateteres. As amostras foram colocadas num suporte metálico e então feita a cobertura de ouro (*sputter coater K500X, Emitech*.) com 15 mA num tempo de 2,5 minutos.

Analisaram-se as imagens em Microscopia eletrônica de varredura ambiental (*XL 30 ESEM FEG, FEI-Philips, Nederland)* do departamento do laboratório de medicina da autoridade sanitária da provincial de Trento/IT. O microscópio utilizado está apresentado na FIG 3.10. Micrografias de alta definição foram obtidas com uma magnificação de 500 a 4000x. A MEV possui três partes principais: uma coluna eletro-óptica que gera e colima o feixe eletrônico. Um sistema de vácuo incluindo a câmara onde fica a amostra. E a parte de detecção do sinal e o sistema de geração de imagem.



FIGURA 3.10: Microscopia eletrônica de varredura ambiental (*XL 30 ESEM FEG, FEI-Philips, Nederland)*. Camera de inserção da amostra, aonde foi inserido os cortes dos cateteres. Indicação do detector de elétrons secundários.

Para a análise semi-quantitativa da fibrina e dos componentes celulares que constituem o trombo, foi feito uma série de aquisição de imagens sucessivas com a magnificação 500x. Construiu-se uma tira das imagens adquiridas de todo o comprimento do trombo contido no diâmetro do orifício do cateter como apresenta a FIG 3.11. Uma única tira de imagem de alta resolução foi obtida por processamento da imagem e uma grade ampla de 33x33 μm foi sobreposta.

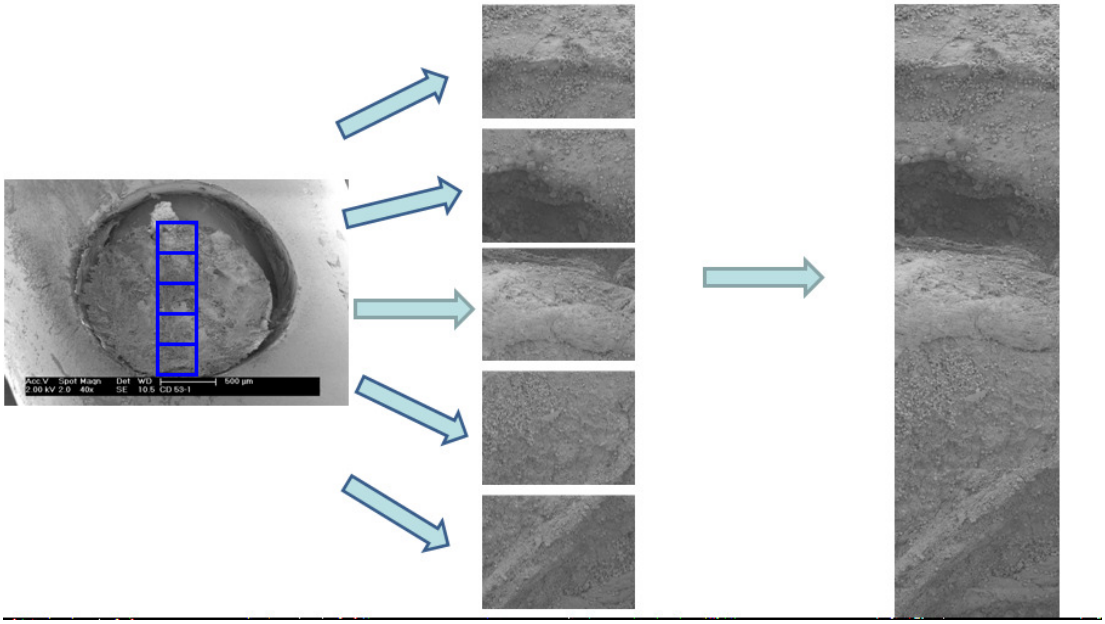


FIGURA 3.11: Montagem das micrografias para análise semi-quantitativa. Região central do trombo no interior do cateter amplificada. Magnificação original 500x.

A observação de cada ponto de cruzamento da grade permitiu quantificar as seguintes caracteríscticas micro-morfológicas: a) *Placa de fibrina:* rede de fibrinas densa e espessa; b) *Rede de fibrina*: malha de fibrinas com fibras grossas e finas dispostas entrelaçadas como um emaranhado; c) *Fibras de fibrina:* Rede de fibras de fibrina com fios de fibra unica;d) Plaquetas: células em forma de discoide irregular com cerca de 2 μm de diâmetro aparecendo como agregado ou aderida as fibras de fibrina; e) *Eritrócitos*: células em forma de disco bicôncavo com cerca de 7 μm de diâmetro;f) *Leucócitos:* estruturas esféricas com superficie irregular com cerca de 6 a 8 μm de diâmetro;g) *Outros*: morfologias diferentes das descritas anteriormente. Micrografias representativas das micro-morfologias são reportadas na FIG 3.12. Diferentes magnificações foram usadas para melhor especificar as carateristicas morfológicas.

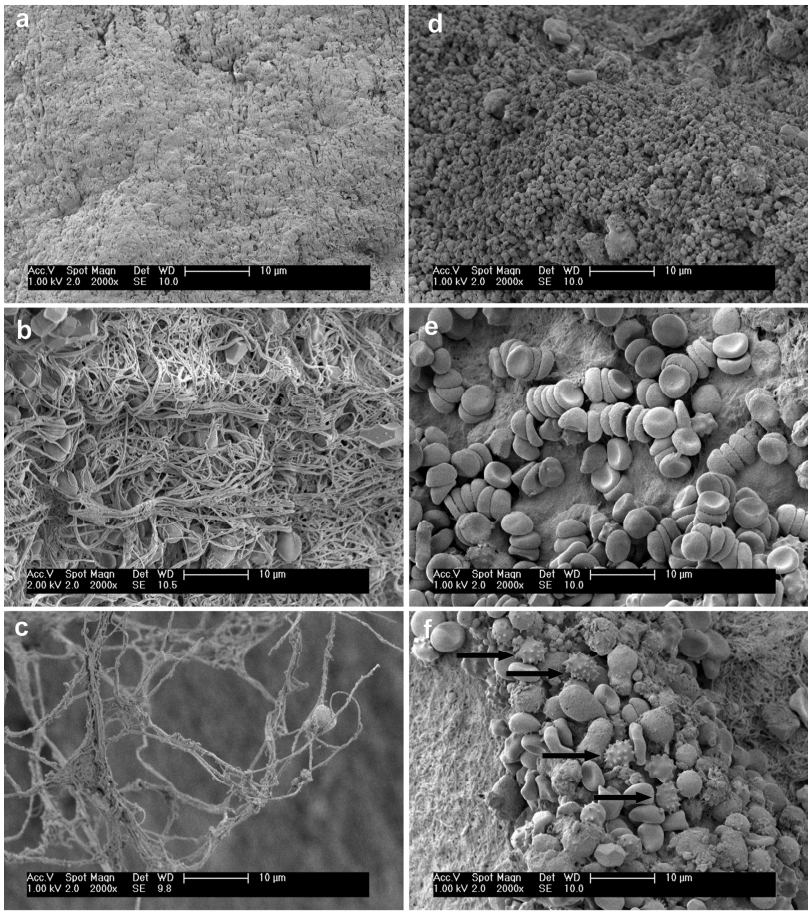


FIGURA 3.12: Diferentes micro-morfologias encontradas no trombo. Da parte superior da imagem a inferior: a) placa de fibrina, b) rede de fibrina, c) fibra de fibrina, d) plaquetas aderida à fibrina, e) Eritrócitos, f) Leucócitos. Magnificação original 2000x.

A porcentagem de ocorrência de cada característica micro-morfológica em cada tira foi computada como uma análise descritiva não paramétrica, espressa como mediana e interquartil (25-75%). A computação do *total de fibrina* foi considerada por acúmulo de contribuição de *placa de fibrina*, *rede de fibrina e de fibras* em cada amostra.

3.7) Protocolo Microscopia de Varredura a Laser de Dois Fótons

Segundo Goppert-Mayer que desenvolveu a teoria de absorção de dois fótons em 1931, a absorção de dois fótons é proporcional ao quadrado da intensidade do laser de excitação (CALDINI, 2009). Além disso, o comprimento de onda para a absorção de dois fótons é tipicamente o dobro do comprimento de onda necessário para uma excitação única (CALDINI, 2009; TSAI; KLEINFELD, 2009). Esta regra, entretanto, deve ser verificada para cada fluoróforo (utilizado para produzir fluorescência da amostra). A diferença entre a excitação de um único fóton com a excitação de dois fótons na emissão de fluorescência é o comprimento de onda, que é muio mais curto que o comprimento de excitação.

O laser utiliza tubos de fotomultiplicadores para coletar a fluorescência emitida de cada amostra. A profundidade de penetração da luz de excitação é consideravelmente maior porque os comprimentos de onda mais longos apresentam uma difusão menor e, por isso podem penetrar com uma maior profundidade em amostras difusíveis como em tecidos biológicos (TSAI; KLEINFELD, 2009). O comprimento de onda infravermelho é menos prejudicial às células e aos tecidos. No entanto, as amostras com alto coeficiente de absorção no infravermelho podem sofrer danos térmicos. Sendo assim, uma das principais vantagens é a profundidade de observação da amostra podendo chegar até cerca de 700μm.

Em conclusão, a capacidade de seccionamento óptico (discriminação em profundidade) é derivada a partir da dependência quadrática do processo de excitação não-linear e uma forte capacidade para focar a lente do microscópio (PRAIRE TECHNOLOGIES, 2009).

Portanto, a fluorescência pode ser detectada sem a necessidade de "*scanning*", colocando um dispositivo de detecção de dois fotons, com uma elevada eficiência quântica na gama da fluorescência, o mais próximo possível da amostra (CALDINI, 2009). Não há nenhuma razão válida para fazer um descan da fluorescência porque isto leva a uma perda de sinal devido aos espelhos e outros componentes óticos associados.

No presente estudo, as amostras para a microscopia de varredura a laser de dois fótons foram armazenadas em solução de formaldeído tamponado 4% até o dia da observação. Logo antes da observação microscópica as amostras foram lavadas por imersão por dois minutos em água deionizada,

fixada com corante fluorescente por imersão em 1mM de solução de Rodamina 6G (Sigma aldrich n° 83697) em água deionizada por 20 minutos em ambiente escuro.

As amostras foram lavadas novamente por 2 minutos em água deionizada para eliminar o excesso de corante, montada em uma placa de petri com uma fita adesiva de dupla adesão para a fixação da amostra e preenchida com água deionozada para a imersão da amostra durante a observação. As amostras foram observadas no Microscópio de Varredura a Laser De Dois Fótons (Ultima IV, Prairie Technologies/Middleton, WI/USA) equipado com laser pulsado ultra-curto (Mai Tai Deep See HP, Spectra-Physics) como fonte de excitação (FIG 3.13).

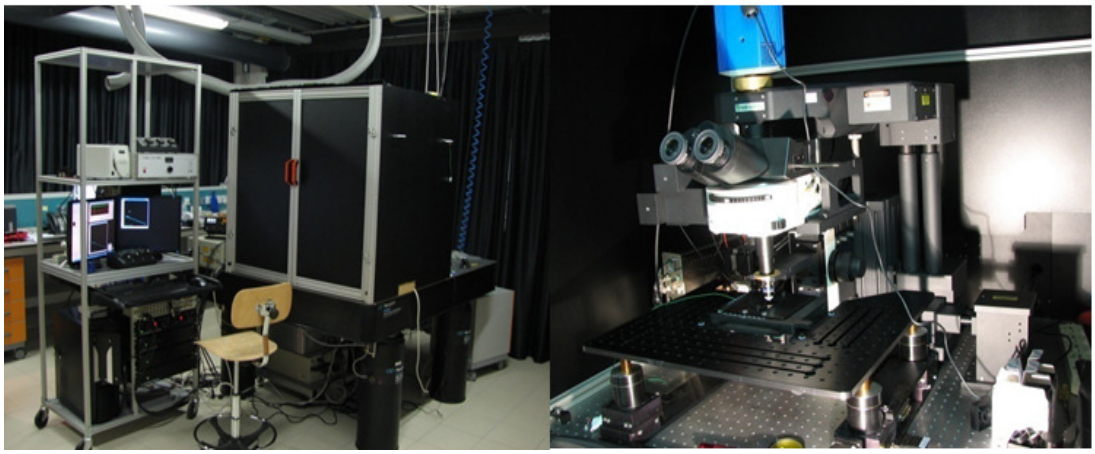


FIGURA 3.13: Microscópio de varredura a laser de dois fótons (Ultima IV, Prairie Technologies) equipado com laser pulsado ultra-curto (Mai Tai Deep See HP, Spectra-Physics) como fonte de excitação.

O comprimento de onda de excitação foi de 800 nm e a fluorescência foi coletada na banda vermelha. A potência do laser variou de 0,70-1,49 mW na coleta das imagens. As imagens foram adquiridas com uma lente objetiva a 100x (NA 1.0, imersão em água, Olympus LUM Plan FI) e o tempo que o laser permaneceu na imagem foi de 50µs. Técnicas de varreduras em Z foram realizadas a fim de analisar a as camadas sub-superficiais do trombo em até 50 microns em profundidade. A técnica de varredura em Z possibilita uma medida de profundidade da amostra à medida que a lente objetiva aproxima ou se afasta do tecido (CALDINI, 2009; PRAIRE TECHNOLOGIES, 2009; TSAI; KLEINFELD, 2009). Permite a obtenção de uma série de imagens ao longo do eixo Z por meio da

inserção da posição inicial e da profundidade final que se deseja coletar as imagens e avaliar o conjunto de imagens dentro de uma faixa estabelecida.

As imagens foram processadas no programa Image J (NIH, USA), convertidas em TIFF para padronizar as imagens em cores falsas e avaliar qualitativamente a presença de fibrina, eritrócitos, leucócitos e plaquetas.

Na obsevação das amostras, possiveis autofluorecência do trombo foi excluida num comprimento de onda de 690-1040nm. Encontrou-se autofluorecência do cateter um comprimento de onda acima de 800nm na banda verde (525/70nm). Neunhum sinal de autofluorecência foi encontrado na detecção do canal (banda vermelha 607/45nm).

No que diz respeito à instrumentação, o microscópio deve ser montado numa mesa isolada de vibração. Pulsos de laser de femtosegundos são as fontes de laser mais comuns para um microscópio de multifotons. Pulsos de laser de femtosegundos têm potência de pico com alta potência instantânea na gama de quilowatts para megawatts e uma potência média entre miliwatts e os watts.

Uma técnica para aumentar a intensidade de fluorescência na excitação de dois fotons é de diminuir frequência de repetição do impulso de laser e manter a potência do laser média. O laser deve possuir as seguintes características: a) um impulso de duração de 100fs, b) frequência de repetição do impulso de 100 a 800MHz; c) laser sintonizavel: para cobrir uma banda de multiplos cromóforos (700-1100nm); d) pico de potência de aproximadamente 10Kv.

O número de fótons absorvidos pelo fluoróforo por impulso é inversamente proporcional a duração do impulso. Assim, um aumento da duração do impulso do laser causado pela dispersão de velocidade de grupo, leva a uma diminuição do número de fotons absorvidos pelo fluoróforo e então uma diminuição da fluorescência devido à excitação multifotônica.

3.8) Protocolo dos estudos histológicos

A histologia permite a obtenção de preparados histológicos permanentes (lâminas) para estudo ao microscópio óptico. Neste instrumento, os objetos são examinados por transparência e como órgãos muito delgados são raros, a maioria precisa ser reduzida a cortes finos, suficientemente transparentes

para serem examinados ao microscópio. Embora a fixação do tecido com formaldeído tamponado 4% endureça o tecido, o material não se torna suficientemente firme ou coeso para permitir cortes delgados perfeitos.

Para que esse grau de firmeza seja atingido, o tecido deve ser completamente impregnado com algum meio de sustentação que manterá juntas as células e as estruturas intercelulares. Entretanto, a preparação do tecido histológico e as colorações possibilitam a perda de algumas informações bioquímicas e metabólicas. Para o preparo dos tecidos os segmentos dos cateteres contendo os trombos, foram imersos em água corrrente por duas horas para eliminar o excesso do formaldeído tamponado 4%. A seguir, as amostras permaneceram uma hora em água bidestilada.

A primeira etapa da preparação do tecido é denominada *desidratação*, na qual a água é extraída dos tecidos por meio de concentrações crescentes de etanol: 50% (duas passagens de uma hora), 70% (três passagens de uma hora e meia), 95% (duas passagens de uma hora) e 100% (uma passagem de uma hora). A água é retirada do tecido para se evitar retração pronunciada do tecido ocasionando lesões estruturais da célula de caráter irreversível. O álcool tem a vantagem de endurecer o tecido.

Após esta etapa o tecido foi submetido à *diafanização (Clarificação)* por meio do xilol (duas passagens de 15 minutos), agente clarificador porque torna o tecido semi-translúcido, quase transparente. A seguir, as amostras foram imersas em parafina fundida numa estufa a 60ºC. Devido ao calor, o xilol evapora, e os espaços anteriormente ocupados pela parafina ficam livres. O tecido permaneceu imerso em parafina líquida, sendo submetido a duas trocas, ainda em estufa, (no período de uma hora cada) para assegurar a substituição de todo o agente clarificador pela parafina.

Após o tempo necessário em parafina fundida, as amostras foram inseridas em um molde metálico para preparação dos blocos de parafina. Os blocos de parafina, contendo os tecidos incluídos, foram seccionados pelo micrótomo, obtendo-se geralmente cortes de 5 μm de espessura. Os cortes foram distendidos em banho-maria a 47^0 C com albumina glicerada. As fitas de parafinas foram coletadas com as próprias lâminas e deixadas em estufa para secar num período de 24 horas.

Para desparafinizar e hidratar os cortes, as lâminas foram deixadas: a) 30 minutos em xilol 1, b) 5 minutos em xilol 2, c) 5 minutos em etanol 1- 100%, d) 5 minutos em etanol 2- 100%, e) 5 minutos em etanol 90% f) 5 minutos em etanol 70% g) 5 minutos em água bidestilada.

A seguir foram feitas as seguintes colorações:

1) Hematoxilina e Eosina (H&E):

   Protocolo: Hematoxilina de Mayer filtrada: imersão por 10 minutos e Eosina G: imersão por 30 segundos.

2) Coloração de Carstairs: método específico para diferenciar as seguintes estruturas: fibrinas, plaquetas e eritrócitos. A coloração foi modificada da coloração original (CARSTAIRS, 1965). Como a amostra deste estudo é diferente do tecido que foi avaliado na coloração original, fizeram-se sucessivos testes ao período de tempo de imersão de cada solução até encontrar um tempo em que possibilitasse a visulaização microscópica diferenciada de cada estrutura do trombo. Além disso, a solução saturada de acido pícrico em etanol foi utilizada no lugar da solução saturada de acido pícrico em álcool isopropilico proveniente do protocolo original. Diantes dos testes de viabilidade da coloração no tecido trombótico chegou-se ao seguinte protocolo:

1) As lâminas foram imersas em solução de alúmen férrico 5% por 5 minutos,
2) Enxaguados em água de torneira por 5 minutos,
3) Corados com H&E por 5 minutos,
4) Enxaguados em água de torneira por 5 minutos;
5) Corados com solução *picro-orange* (ácido pícrico saturado em água, 20 mL, ácido pícrico saturado em etanol, 80mL, *Orange G* 0,2g) por 4 minutos;
6) Enxaguados brevemente em água destilada;
7) Corados em solução de *Ponceau-fuchsin* (0,5 fucsina ácida, 0,5g *Ponceau* 2R, 1,0 mL ácido acético, água destilada para 100 mL) por 2 minutos;
8) Enxaguados em água destilada;
9) Diferenciados em ácido fosfomobilítico 1% por 3 minutos;
10) Enxaguados em água destilada;
11) Corados com azul de anilina em 1% de ácido acético por 5 minutos;
12) Enxaguados em ácido acético 1% por 3 minutos;
13) Enxaguados em água destilada.

Após as colorações, as lâminas foram inseridas em etanóis ascedentes para desidratação (etanol 70% por 5 segundos, etanol 90% por 5 segundos, duas passagens em etanol 100% (10 segundos cada) e em 2 passagens de xilol para clarificação (sendo 10 segundos em cada). Finalmente as lâminas foram montadas para a observação no microscópio óptico.

De acordo com a coloração de Carstairs o processo de fixação que apresenta um tempo maior ou igual a 48 horas, as fibrinas coloram de vermelho brilhante, as plaquetas podem variar de azul acizentado a marinho, colágeno de azul brilhante, músculo de vermelho e eritrócitos de amarelo.

A FIG 3.14 apresenta a coloração de Carstairs no interior do orifício venoso, apresentando a fibrina em vermelho, plaquetas em azul acizentado a marinho e glóbulos vermelhos em amarelo.

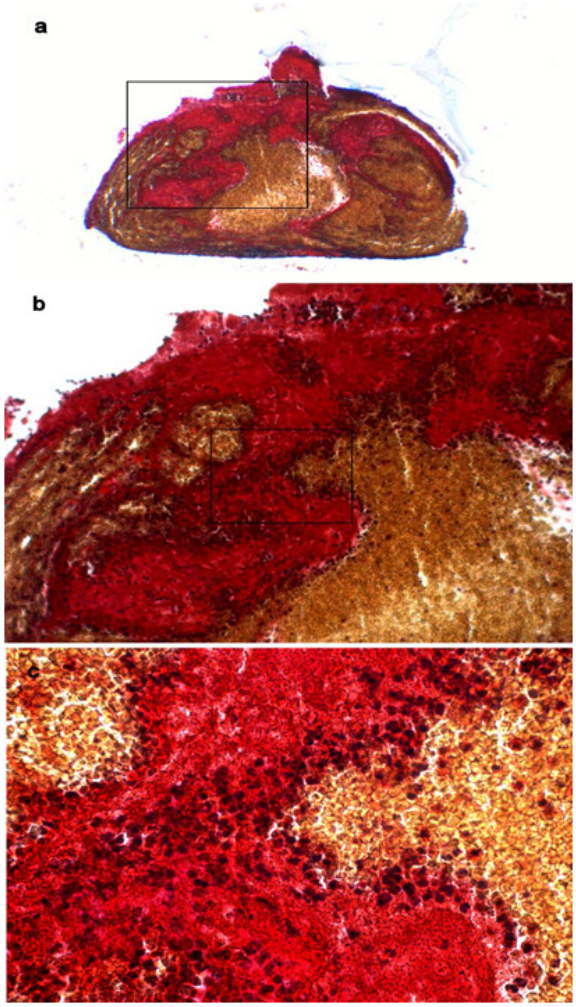


FIGURA 3.14: Análise na microscopia de luz. Coloração de Cartairs, (a) magnificação 40x. Plaquetas (em azul acizentado a marinho), fibrina (vermelho brilhante) e eritrócitos (amarelo) (b) 100x; (c) x200. Escala de barra: 50µ.

3.9) Processamento de imagens e microscopia óptica em transmissão de luz e de fluorescência

As lâminas histológicas foram observadas no microscópio de luz que consiste em uma técnica de observação de objetos e sistemas com ampliações de algumas dezenas até milhares de vezes das dimensões físicas, tipicamente 10x a 1500x. A distância entre as lentes e a amostras pode ser alterada por meio de um sistema de engrenagem, permitindo o ajuste do foco pelo observador. O equipamento consta ainda com um sistema de iluminação, filtros, colimadores, e outras partes, no sentido de otimizar a qualidade da imagem obtida. O microscópio apresenta dois sistemas de lentes convergentes; a objetiva e a ocular. A objetiva é um conjunto de lentes que apresenta pequena distância focal e que fornece uma imagem real e aumentada do objeto que é observado. A ocular, também formada por lentes convergentes, funciona como uma lupa, que nos dá uma imagem virtual e aumentada da imagem real que se formou em pela objetiva. A ampliação final de um microscópio de luz será o resultado do produto obtido pela ampliação da lente ocular pela objetiva. As ampliações das lentes objetivas situam-se na faixa de 4x a 100x. As lentes oculares geralmente oferecem aumentos de 8x a12x, sendo a de 10x a mais comun. Portanto, ampliações típicas de microscopia óptica situam-se na faixa de ~40x a ~1000x.

Neste estudo utilizou-se o microscopio de luz, microscópio óptico de campo amplo com transmição de luz e de fluorescência (DMIL invertoscope, Leica, Wetzlar, Germany) com uma magnificação de 40 x, 100x e 200x.

As lâminas histológicas coradas com H&E foram utilizadas para quantificar a quantidade de fibrina no tecido por meio da microscopia de fluorescência. A fluorescência é um tipo de luminescência (emissão de luz) em que uma determinada amostra absorve luz e após um curto intervalo de tempo reemite essa luz.

O princípio fundamental da microscopia de fluorescência está relacionado com o fluorcromo (moléculas capazes de emitir luz fluorescente) que quando excitado por luz, em um determinado comprimento de onda, responde emitindo luz em outro comprimento de onda. Os fluorcromos reagem diferentemente pela absorção e emissão de luz em comprimentos de ondas característicos. No microscópio

há um dispositivo de excitação por uma luz em determinado comprimento de onda e a imagem observada será dada pela emissão de luz em comprimento de onda diferente.

Assim, a microscopia de fluorescência deve permitir que uma luz de excitação atinja a amostra e captura a luz emitida para a sua visualização. Uma lâmpada especial (vapor de mercúrio em geral) produz luz em diversos comprimentos de onda; um filtro de excitação permite a passagem de uma faixa de comprimento de onda específica que será desviada pelo espelho dicrótico (reflete o laser, sendo transparente para os outros comprimentos de onda da luz), será concentrada pela objetiva e alcançará a amostra.

Neste estudo, utlizou-se uma luz de excitação na linha verde de mercúrio (espectro de excitação 460 - 550nm) e uma banda de emissão com filtro de luz vermelha. Utilizou-se uma objetiva 4x (Leica C PLAN, NA=0.10) e uma câmera colorida CCD (DMIL 420, Leica, Wetzlar, Germany). O tempo de exposição foi de 2 segundos e a resolução das imagens foi de 2592 x 1944 pixels (RGB 16 bits).

Para a análise da microscopia óptica em transmissão de luz e de fluorescência, obtiveram-se 31 CVC (26 não tunelizados CVC, Med COMP/HEMO-CATH®, Harleysville, PA, USA e 5 tunelizados CVC, Palindrome ™, Mansfield, MA, USA) coletados de pacientes (idade média de 62(35-84) anos; masculino:feminino 23:8; média de tempo de inserção 17(5-150) dias para não tunelizados e 183(132-1080) dias para tunelizados).

Para a visualização e processamento das imagens seguiu-se o seguinte protocolo:

a) As imagens foram importadas para o programa Image J (NIH) e convertidas para 8 bits numa escala de cinza, apresentada na FIG 3.15;

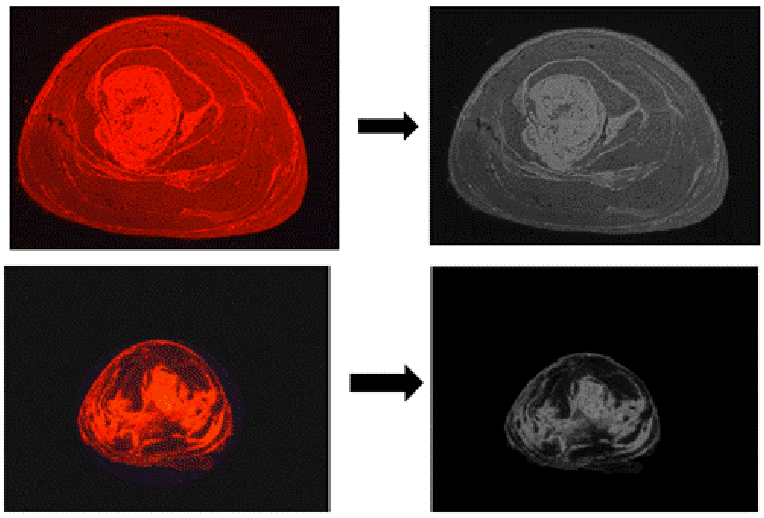


FIGURA 3.15: Imagens em microscopia de fluorescência convertidas para 8 bits numa escala de cinza.

Identificou-se a área de seção total do trombo, por meio de uma segmentação de imagens. A segmentação da imagem é efetuada varrendo-se a imagem, pixel por pixel, e rotulando-se cada pixel como sendo do objeto ou de fundo, dependendo se o nível do pixel é maior ou menor que o limiar único posicionado no histograma. A seleção limiar no presente estudo, foi feita de forma automática e, como foi utilizada apenas os pixels sobre ou perto da fronteira entre o objeto e o fundo, o histograma obteve dois picos com alturas paroximadamente iguais. A FIG 3.16 a seguir apresenta a área total do trombo em preto (0-74). O histograma (75-101) representará uma determinada área do tecido de alta fluorescência.

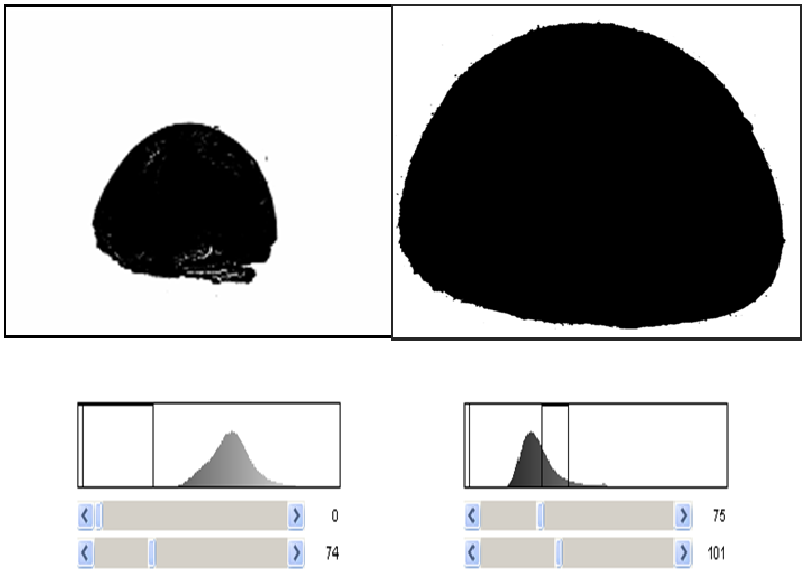


FIGURA 3.16: Área total do trombo em preto obtida por segmentação da imagem. Histograma (0-74) representa a área total do trombo. Histograma (75-101) representará uma determinada área do tecido de alta fluorescência.

b) Computação e armazenamento do número de pixel associado à area de seção do trombo;

c) Limiarização binária (*thresholding*)**:** o valor encontrado previamente será o menor valor e o novo maior valor irá determinar a area do trombo que se deseja definir (histograma (75-101) representado na FIG 3.16. A FIG 3.17 mostra em branco, a área altamente fluorescente presente no trombo e em preto a área com menor fluorescência.

A limiarização automática de uma imagem transforma uma imagem definida em níveis de cinza numa imagem definida a preto e branco (binária). Este método é baseado no processamento do histograma da imagem. O algoritmo assume que a imagem se divide em duas classes: o fundo e o objeto propriamente dito.

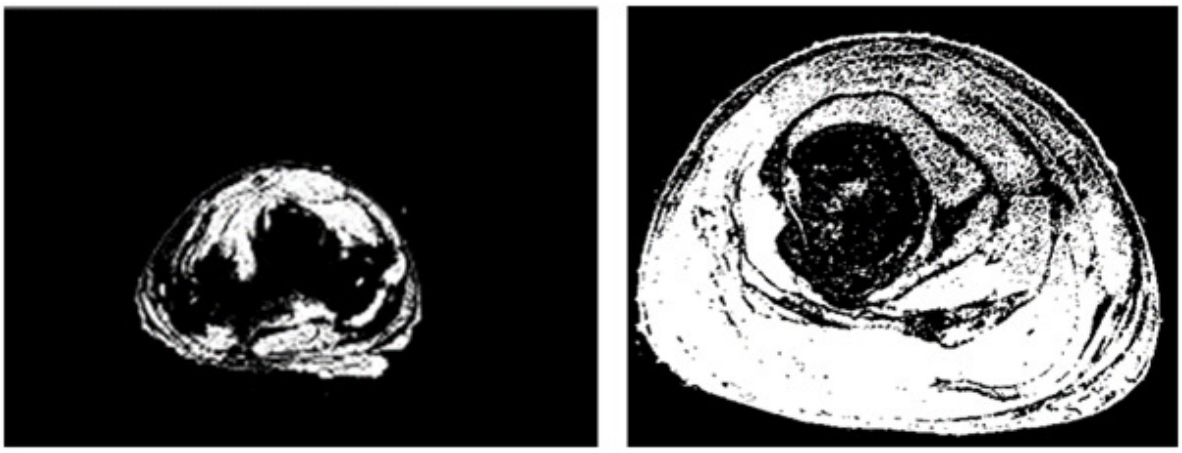


FIGURA 3.17: Limiarização binária: definição da área altamente fluorescente e daquela com pouca fluorescência.

d) Computação e armazenamento do número de pixel associado à area de secção do trombo altamente fluorescente;

e) Computação percentual da secção do trombo relacionada à área de alta fluorescência e a porcentagem da secção do trombo relacionada à área fracamente fluorescente. Foram feitas três análises da porcentagem de cada lâmina com H&E. Obteve-se valor da média das três porcentagens avaliadas e o desvio padrão entre as três medidas apresentaram-se < 4,0 (ANEXO D).

f) As áreas altamente fluorescentes foram relatadas como fibrina e áreas fracamente fluorescente como eritrócitos após a comparação dos resultados de fluorescência com as secções coradas com o método de Carstairs.

A FIG.3.18 mostra as etapas na seção corada com H&E (a), contraste de fluorecência (b), colorido em branco (c) indicando a área total do trombo e (d) indicação da área altamente fluorescente colorida em branco e aquela com baixa fluorecência em negro.

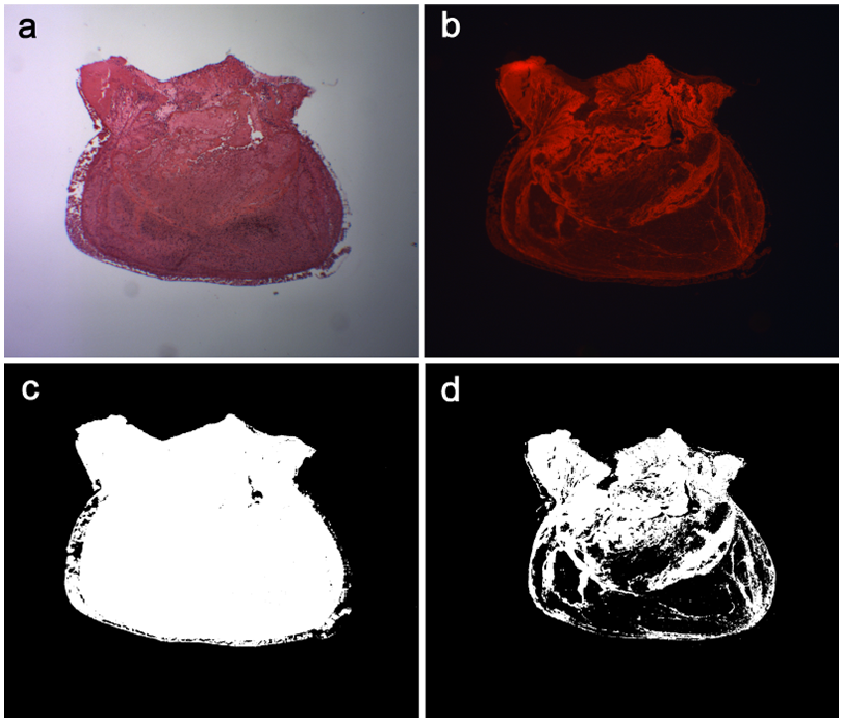


FIGURA 3.18: Processamento das imagens: a) coradas em H&E, b) imagem em fluorescência, c) área total do trombo em branco, d) Indicação da área altamente fluorescente (branco) e daquela com baixa fluorescência (negro).

Realizaram-se comparações estatísticas entre os seguintes grupos: *grupo 1:* cateteres de 0-15 dias de permanência no paciente, *grupo 2:* cateteres de 16-60 dias no paciente e *grupo 3*: mas que 60 dias de permanência. Os grupos foram avaliados quanto à normalidade pelo teste Shapiro-Wilk e se distribuíam normalmente com o valor de $p>0,05$. Os testes foram realizados no programa *Software Statistical Package for Social Sciences* (SPSS) versão 19.0 sendo possível analisar a média e o desvio padrão dos grupos (Média±DP). Verificou-se ainda o intervalo interquartil dos grupos (percentil 25 - 75%).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1) Estudo numérico do efeito do escoamento venoso na parede externa do CVC não tunelizado

Neste subcapítulo, descreveu-se a simulação no interior da veia, quando na presença e ausência do cateter. Neste caso, o estudo numérico no interior do cateter não foi feito. Descreveu-se o escoamento sanguíneo quando em contato com a parede externa do CVC.

No que se referem aos valores de velocidade no regime laminar de fluidos newtonianos e não-Newtonianos, discutiu-se valores no tempo t=0,42s que são os valores encontrados no pico da sístole cardíaca e no tempo t=0,70s que são os valores encontrados no final da sístole na presença e na ausência do cateter.

No fluido não-Newtoniano (t=0,42s), a velocidade do escoamento venoso com cateter aumentou cerca de 40% no valor mínimo da velocidade quando comparado ao escoamento sem a presença do cateter. No tempo t=0,70s a velocidade do escoamento aumentou em 50% no valor mínimo de velocidade. A presença do cateter contribuiu para o aumento da velocidade mínima e de áreas de recirculação do escoamento. A recirculação cria uma variação nos valores de tensão de cisalhamento e velocidade e, consequentemente um distúrbio na direção do escoamento (PAUL *et al.*, 2009). Esse processo contribui para a progressão do processo de coagulação mediado pelas células endoteliais da veia, uma vez que, altera a morfologia e funções dessas células (CHUNG; HU, 2008; SOULIS *et al.*, 2008; WHONER *et al.*, 2012).

As zonas de recirculação foram observadas no final da sístole nos fluidos não-Newtonianos e newtonianos. O padrão detalhado das linhas de corrente na veia com a presença e ausência do cateter num fluido não-Newtoniano é apresentado nas FIG 4.1 (a) e (b) respectivamente. Na FIG 4.1 (b) mostra a mesma região da veia apresentando menores áreas de recirculação, menor quantidade de vórtices quando na ausência do cateter venoso. Neste sentido, pequenas áreas de recirculação e escoamento reverso no decorrer do ciclo cardíaco é uma condição fisiológica na veia cava (PAUL *et al.*, 2009). No entanto, o aumento no distúrbio do escoamento sanguíneo pode acarretar em aceleração do processo de coagulação e formação de trombos.

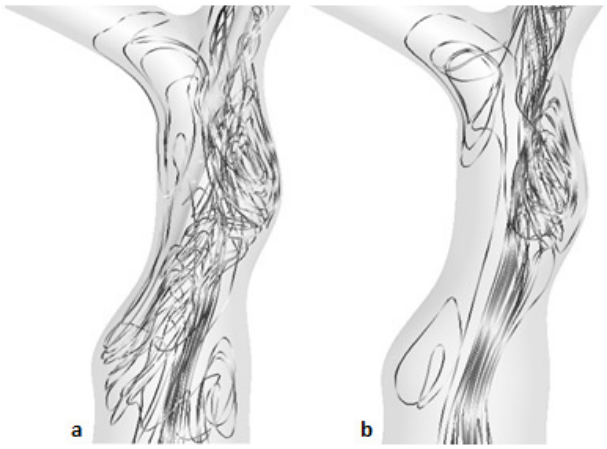


FIGURA 4.1: Distribuição da velocidade nas linhas de corrente no pico da sístole (t=0,40s) no modelo não-Newtoniano com cateter (a) e sem cateter (b). Final da sístole (t=0,70s) com cateter(c) e sem cateter(d).

Ressalta-se que, a presença de recirculação além de ativar os fatores de coagulação induz a formação de fibrina e variação na tensão de cisalhamento máxima e mínima, contribuindo para a formação inicial do trombo. Tal fato contribui para explicar a formação inicial de fibrina sobre o cateter num período de 24 horas após a inserção do cateter. É importante ressaltar que, o cateter induz uma reação complexa de absorção de proteínas do plasma e adesão de plaquetas numa resposta inflamatória intrínseca ao material polimérico na corrente sanguínea (CHEN *et al.*, 2008; WU *et al.*, 2008). E, áreas de recirculação contribuem para a ativação deste processo e no desenvolvimento de trombos intraluminais. Um escoamento oscilatório é caracterizado pelo tempo médio de flutuações da tensão de cisalhamento durante o ciclo cardíaco.

Na parede do cateter em contato com o fluido, a tensão de cisalhamento apresentou valores muito baixos em algumas áreas e valores mais elevados em outras. Tal comportamento deve-se principalmente aos ciclos de escoamento reverso e distúrbios do escoamento devido à presença do cateter. A FIG 4.2 mostra a distribuição da tensão de cisalhamento ao longo da parede externa do cateter num fluido não-Newtoniano nos tempos t=0,42s e t=0,75s.

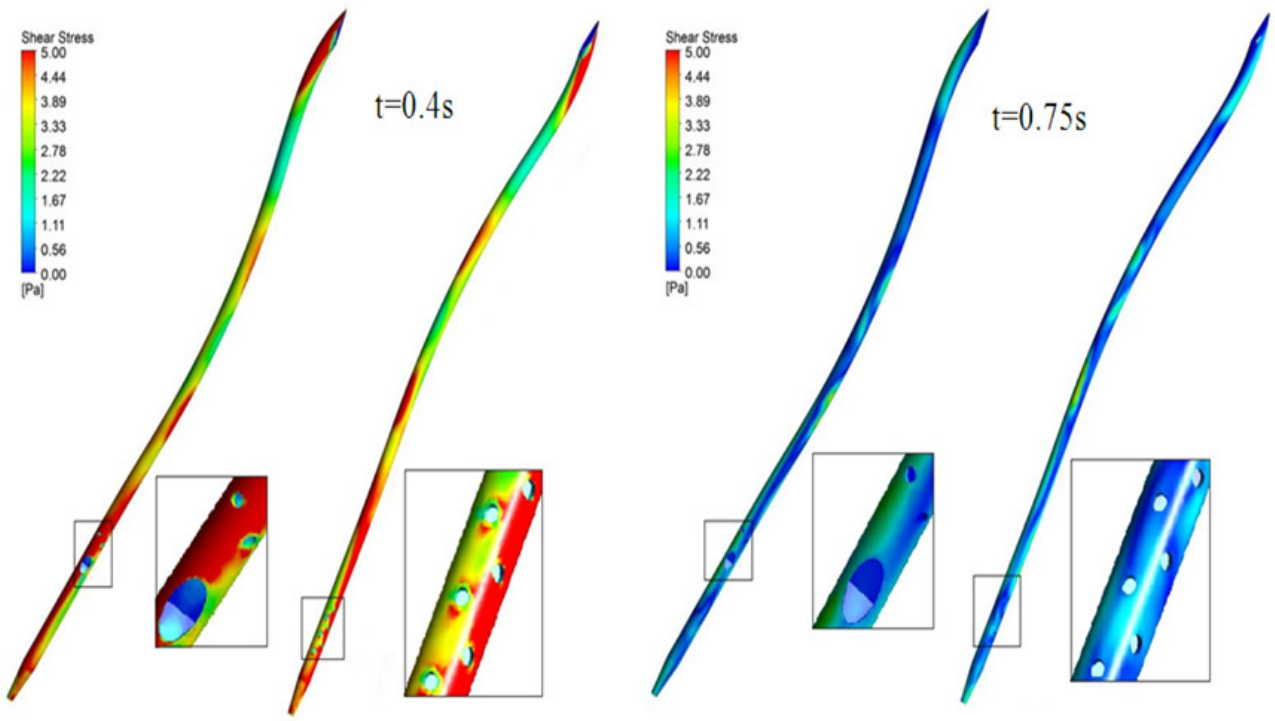


FIGURA 4.2: Distribuição da tensão de cisalhamento na parede do cateter no fluido não-Newtoniano no pico da sístole (t=0,42s) e início da diástole (t=0,75s) durante o ciclo cardíaco.

No tempo t=0,42s, encontrou-se áreas de alta tensão de cisalhamento (5,0 Pa) ao redor da parede que circunda o maior orifício lateral do cateter e dos orifícios laterais menores. Por outro lado valores em torno de 3,15 Pa também foram encontrados ao redor dos orifícios. Tais diferenças de tensão de cisalhamento podem estimular uma maior adesão de plaquetas na parede externa do cateter próximo aos orifícios laterais. Estudos têm indicado que altos valores de gradiente de tensão de cisalhamento induzem a agregação de leucócitos e consequentemente de marcadores inflamatórios do endotélio venoso aumentando o risco de formação de trombos (AI *et al.*, 2009; SING; WANG, 2011; TOKAREV *et al.*, 2011; WHONER *et al.*, 2012). O cateter quando em contato com a corrente sanguínea induz mecanismo de adsorção de proteínas e consequente adesão plaquetária. A mudança do perfil da tensão de cisalhamento na parede do cateter durante o ciclo cardíaco pode resultar num maior processo de agregação e adesão plaquetária. Locais de maiores valores de tensão de cisalhamento

apresentam maior transporte convectivo de plaquetas e proteínas plasmáticas e consequentemente, maior será a adesão à parede interna dos orifícios venosos (CHANG, 2011).

Diferente valor de distribuição da tensão de cisalhamento pode ser observado no início da diástole (t=0,75s). Ao longo do cateter, os valores de tensão de cisalhamento diminuíram consideravelmente. Os valores de tensão próximos aos orifícios menores laterais são próximos de zero. Os valores mínimos de tensão de cisalhamento fazem com que as células sanguíneas desloquem com menor velocidade, aumentando a possibilidade de contato e interação com o cateter devido à adesão formada entre receptores presentes nas membranas das plaquetas e as proteínas aderidas na parede do cateter como o fibrinogênio e o vWf (CHANG, 2011).

Quando comparado ao tempo t=0,42s a tensão de cisalhamento na parede do cateteer apresentou-se 60 vezes menor no tempo t =0,75s. A diferença de valores na tensão de cisalhamento entre o pico da sístole e início da diástole em um curto período de tempo, também propicia a ativação de fatores de coagulação na parede do cateter, devido à variação dos valores.

No final da sístole a tensão de cisalhamento diminuiu de 79,48% sendo aproximadamente um oitavo do valor da tensão no pico da sístole. Além disso, a baixa tensão de cisalhamento em quase toda a extensão do cateter apresentada na FIG 4.2 mostra que no tempo t=0,75s ocorre baixa flutuação no escoamento e que também são áreas de risco para a formação de trombos, devido à reorganização endotelial e estase venosa (CHUNG; HU, 2008; SOULIS *et al.*, 2008).

Vale a pena comentar que, na região do ciclo cardíaco em que a contração do átrio causa um pequeno escoamento reverso (t=0,25s) em aproximadamente toda a extensão do cateter a tensão de cisalhamento variou entre 0,70 a 1,05 Pa, sem grandes flutuações da tensão, alcançando um valor de 2,37 Pa na ponta do cateter. Para demonstrar a variação da taxa de deformação, a FIG 4.3 apresenta a diferença entre os modelos newtoniano e não-Newtoniano no tempo t=0,42s onde o escoamento é máximo.

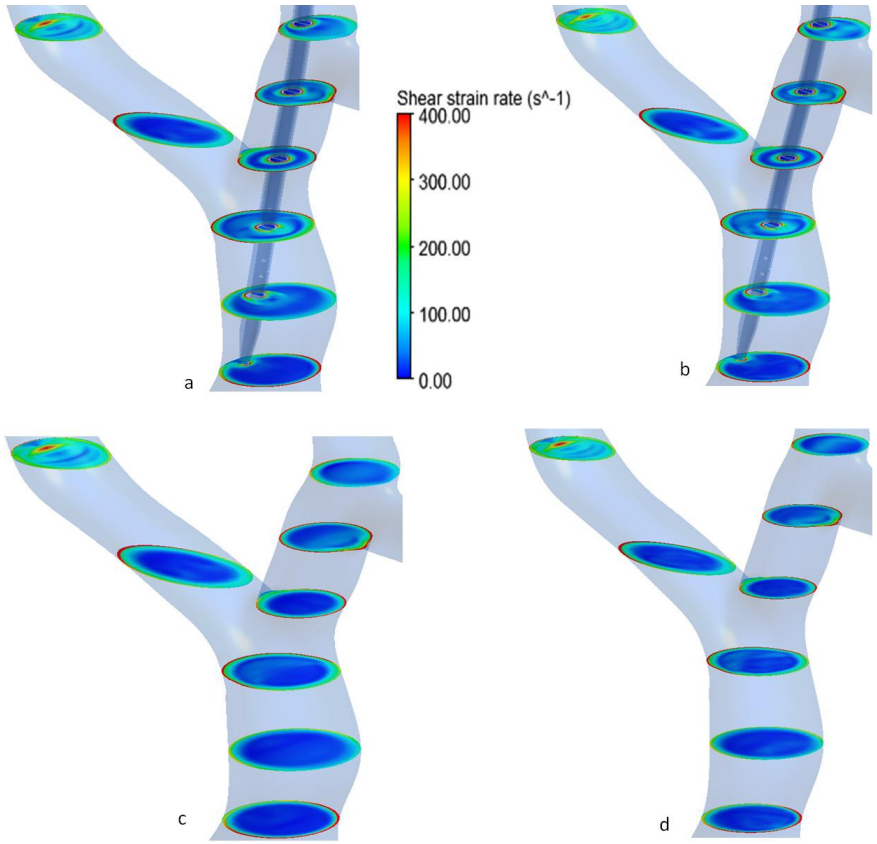


FIGURA 4.3: Distribuição da taxa de deformação do modelo não-Newtoniano com cateter (a), newtoniano com cateter (b), não-Newtoniano sem cateter (c) e newtoniano sem cateter (d).

Ao comparar o modelo não-Newtoniano com e sem cateter, verificou-se um aumento de 98% no valor mínimo da taxa de deformação quando o cateter estava presente no escoamento venoso. Entretanto, na ponta do cateter o valor mínimo da taxa de deformação aumentou em 40%. O mínimo valor da taxa de deformação aumentou cerca de 80% no plano seccionado na ponta do cateter, 38% no terceiro plano partindo do topo da FIG 4.3 e 1% no ultimo plano. No modelo newtoniano comportamentos similares foram observados no valor mínimo da taxa de deformação nos planos, apresentando diferenças menores que 4%.

Entretanto, valores da taxa de deformação no modelo como um todo não incluindo a inserção de planos, apresentaram-se com valores diferenciados nos modelos newtoniano e não-Newtoniano. Ao comparar o modelo newtoniano com e sem cateter a taxa de deformação diminuiu de 56% na presença do cateter e aumentou em 46% no escomento não-Newtoniano. É interessante observar no plano que, à

medida que se aproxima da parede do cateter a tensão de cisalhamento fica maior que $100s^{-1}$. Sabe-se que, o escoamento sanguíneo funciona como não-Newtoniano em tensões menores que 100 s^{-1} (WANG; BERNSDORFF, 2009; ZENG; ZHAO, 2010; LIU *et al.*, 2011). Assim, o escoamento comporta como não-Newtoniano em quase todo o volume do escoamento venoso.

As FIGs. 4.4 e 4.5 apresentam as pressões em secções transversais de planos em diferentes tempos do ciclo cardíaco. Os quatro diferentes tempos correspondem: escoamento diastólico retrógrado (t=0,25s), contração do átrio quando ele esta enchendo o ventrículo direito no final da diástole (t=0,30s), final da contração ventricular (t=0,50s) e quando a válvula tricuspede abre refletindo aumento passivo na pressão e volume do átrio direito quando ele enche no final da sístole e inicio da diástole (t=0,70s). As secções transversais foram feitas nos modelos não-Newtoniano (FIG 4.4) e newtoniano (FIG 4.5) com a presença e ausência do cateter no interior da veia.

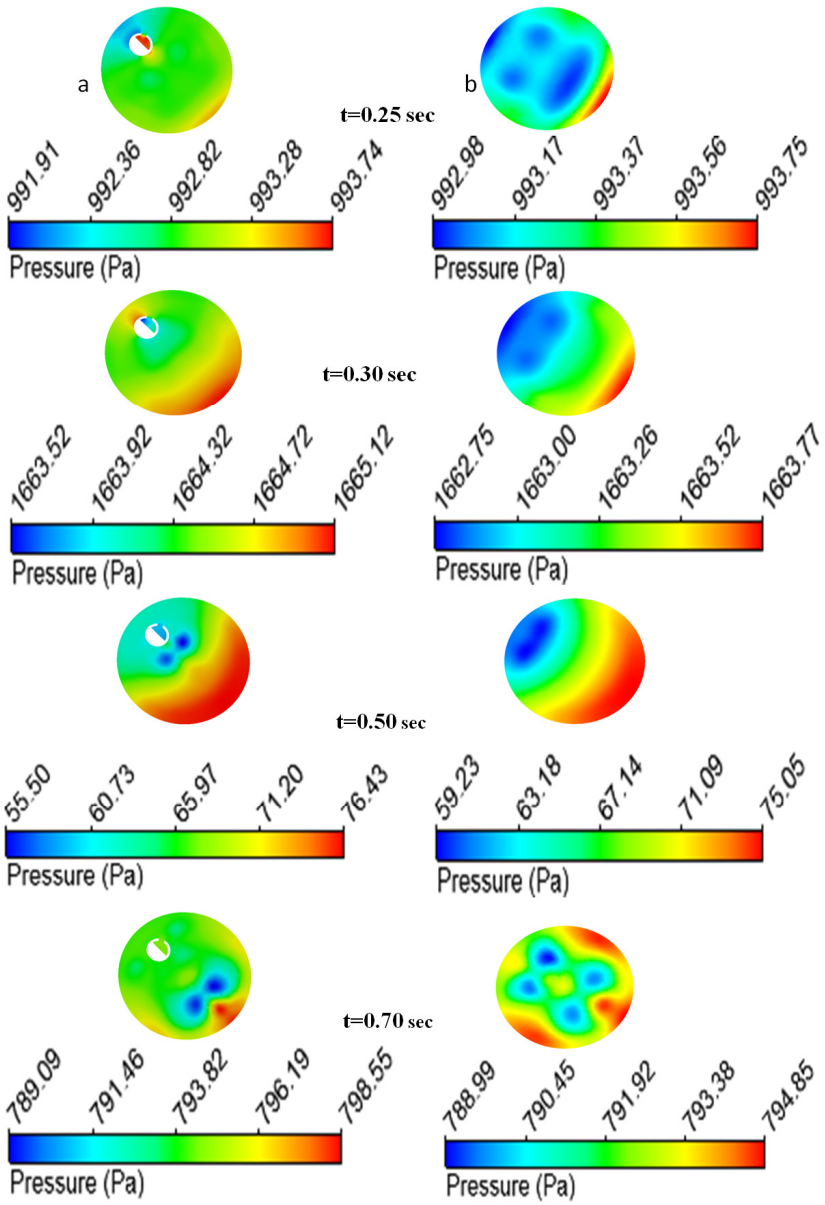


FIGURA 4.4: Secções transversais num regime laminar de um fluido não-Newtoniano na presença do cateter (a) e na ausência do cateter na veia (b), em quatro diferentes tempos do ciclo cardíaco.

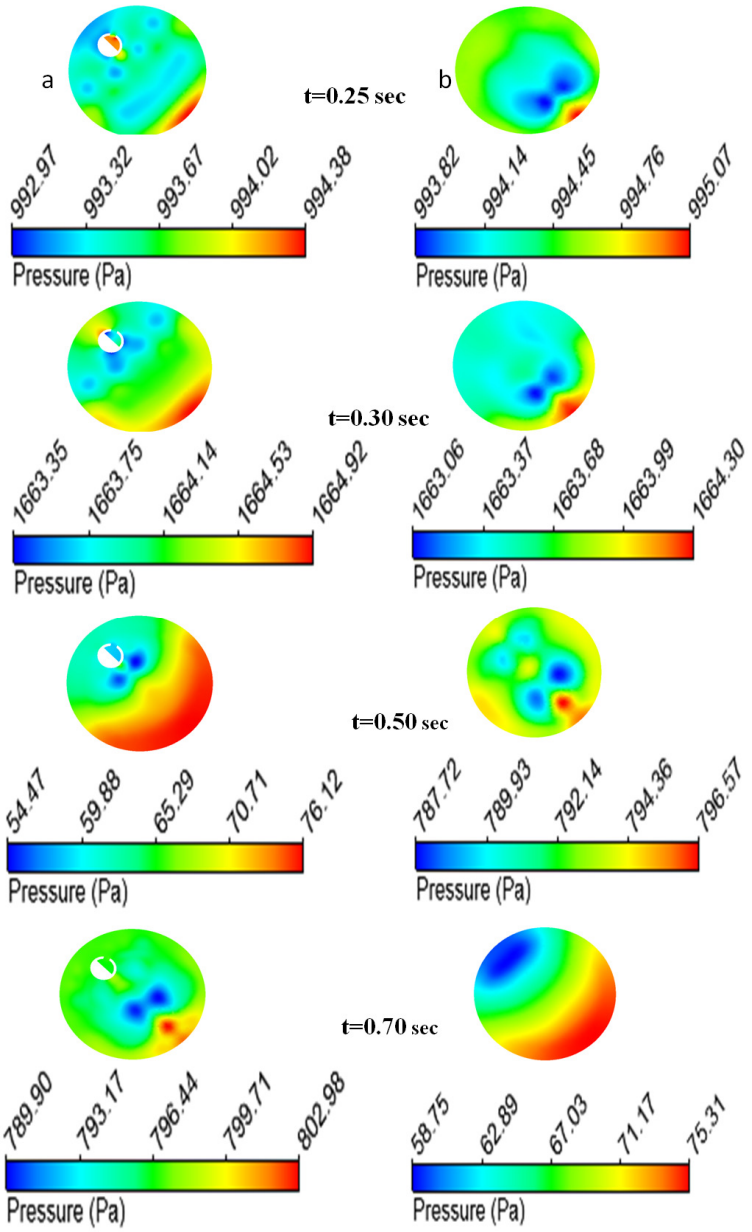


FIGURA 4.5: Secções transversais num regime laminar de um fluido newtoniano na presença do cateter (a) e na ausência do cateter na veia (b), em quatro diferentes tempos do ciclo cardíaco.

A pressão venosa com cateter no fluido não-Newtoniano apresentou um valor mínimo de pressão menor que no escoamento retrógrado na diástole (t=0,25s) e no final da contração ventricular (t=0,70s). No modelo newtoniano a pressão na presença do cateter no tempo t=0,50s apresentou-se menor que no modelo não-Newtoniano. Ressalta-se que, a variação da pressão na presença do cateter

produz tensões de cisalhamento oscilatórias que contribuem para a formação de trombos. Essas suposições sobre os parâmetros hemodinâmicos estão de acordo dados clínicos e literatura pertinente (SUN *et al.*, 2009; WANG; BERNSDORF, 2009; WANG *et al.*, 2012).

A FIG 4.6 apresenta a comparação das tensões de cisalhamento nos regimes laminar e turbulento no modelo não-Newtoniano com a inserção e sem a inserção do cateter na veia jugular.

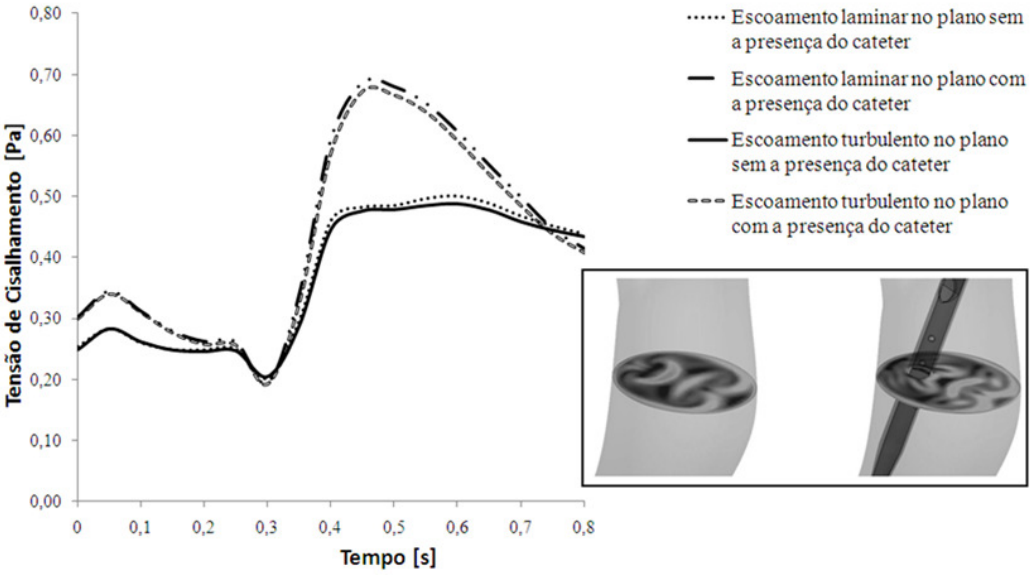


FIGURA 4.6: Comparação do perfil do fluido não-Newtoniano nos regimes laminares e turbulentos com e sem cateter. A imagem apresenta o plano em que os dados de tensão de cisalhamento foram obtidos para a construção do gráfico.

De acordo com a FIG 4.6 observou-se que a maior diferença entre as tensões de cisalhamento entre os regimes laminares com e sem cateter foi de 30% no tempo t =0,42s; com os valores de 0,69 Pa com cateter e 0,48 Pa sem cateter. Esses resultados estão de acordo com um estudo computacional fluido dinâmico em que simulou numericamente o escoamento venoso no interior das veias cavas, subclávias e jugulares internas quando na introdução do cateter de marcapasso (LONYAI *et al.,* 2010). Observou-se que, a tensão de cisalhamento apresentou-se cerca de 25% maior com a presença do marcapasso quando comparada as veias sem o marcapasso, entretanto, os autores esclarecem que algumas regiões da veia a tensão de cisalhamento não variou.

No tempo de 0,55 s a tensão de cisalhamento foi de 0,65 Pa com a presença do cateter e 0,49Pa sem o catater. Assim, na sístole os valores da tensão de cisalhamento se elevam consideravelmente no decorrer do tempo na presença do cateter venoso. Por outro lado, no tempo de diástole, as variações entre os escoamentos foram menores: t=0,70s, a variação da tensão de cisalhamento foi de 6%. O escoamento com cateter apresentou uma tensão de 0,50 Pa e sem cateter de 0,46 Pa. No tempo de 0,25s, a diferença entre o escoamento com a presença e ausência do cateter foi de 4%.

Vale à pena ressaltar que, quase todos os valores de tensão de cisalhamento durente o ciclo cardíaco apresentaram-se maiores no decorrer do tempo com a presença do cateter no escoamento. No emtanto, no tempo de 0,30s a tensão de cisalhamento apresentou-se menor no escoamento em que o cateter não estava presente, com uma diferença de 0,01Pa.

Ao comparar o regime laminar com o turbulento com a presença do cateter, a maior diferença entre as tensões foi de 4% no tempo t=0,42s. No tempo de 0,70s a diferença foi de 3%. Todos os valores de tensão de cisalhamento com cateter no regime turbulento apresentaram-se menores que os valores laminares com cateter. No entanto, as diferenças foram muito pequenas.

No que se refere às diferenças observadas na FIG 4.6 entre os regimes turbulentos com e sem cateter, no tempo t=0,42s a diferença entre os escomentos foi de 30% (0,67 Pa com cateter e 0,47 Pa sem cateter) e no tempo t=0,70 (0,48 Pa com cateter e 0,46 Pa sem cateter) as diferença foram de 5%. Todos os valores no decorrer do tempo apresentaram a tensão de cisalhamento mais alta com a presença do cateter do que quando ausente. As diferenças entre os regimes turbulentos foram muito próximas aos regimes laminares com e sem cateter.

A FIG 4.7, apresenta o fluido newtoniano nos regimes laminares e turbulentos com a presença e ausência do cateter.

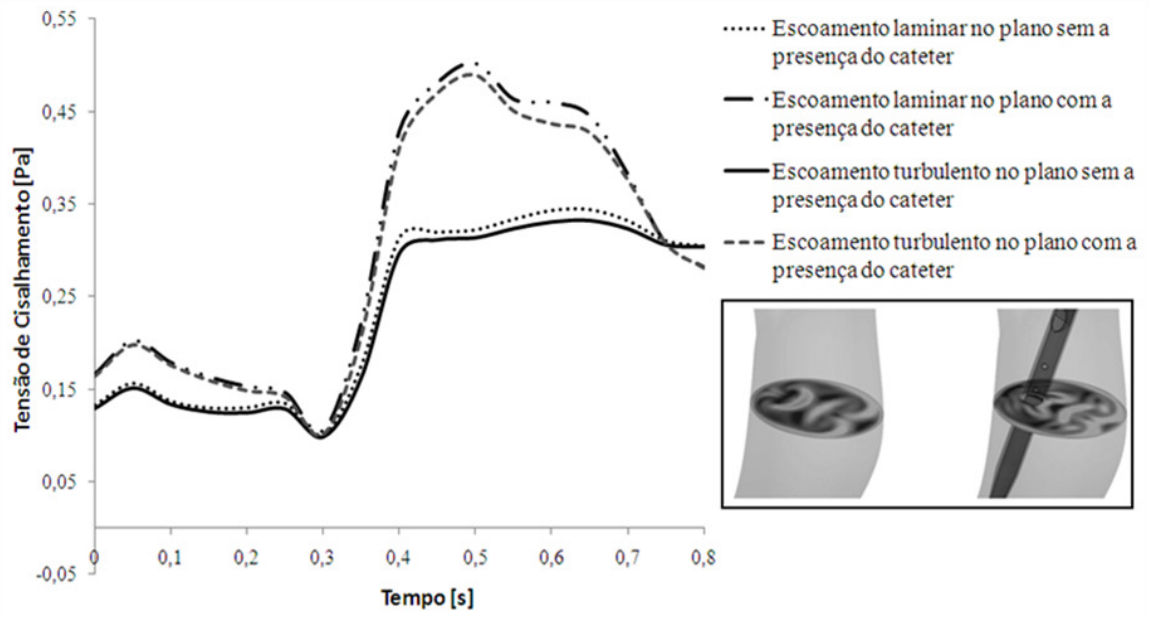


FIGURA 4.7: Distribuição da tensão de cisalhamento nos fluidos newtonianos em regimes laminares e turbulentos, com a presença e ausência do cateter. A imagem representa o plano em que os dados de tensão de cisalhamento foram obtidos.

De acordo com a FIG 4.7, observou-se que a maior diferença entre as tensões de cisalhamento entre os regimes laminares com e sem cateter foi de 36% no tempo t =0,50 s, no tempo de sístole. Com o valor de 0,50 Pa com cateter e 0,32 Pa sem cateter. No tempo t=0,42s a diferença foi de 34% apresentando valores de 0,48 Pa com cateter e de 0,32 Pa sem cateter. Os valores de tensão de cisalhamento no fluido não-Newtotinano apresentaram-se maiores em todos os tempos do ciclo cardíaco, quando comparados ao fluido newtoniano, sendo que no tempo t=0,42s o valor diferiu de 30% na tensão de cisalhamento com cateter e de 34% no valor sem cateter.

No tempo de 0,55s a tensão de cisalhamento foi de 0,46 Pa com cateter e 0,34 Pa sem cateter. Assim como no fluido não-Newtoniano, as tensões de cisalhamento se elevam consideravelmente no decorrer do tempo na presença do cateter venoso. Por outro lado, no tempo de diástole, as variações entre os escoamentos também se apresentaram menores: t=0,70 s, a variação da tensão de cisalhamento foi de 13%. O escoamento com cateter apresentou uma tensão de cisalhamento de 0,38 Pa e o

escoamento sem cateter de 0,33Pa. No tempo de 0,25 segundos, o escoamento com o cateter apresentou uma tensão de cisalhamento 7% maior quando comparado ao escoamento em que o cateter estava ausente.

Ao comparar os regimes laminares e turbulentos com a presença do cateter, a maior diferença entre as tensões foi de 6% no tempo t=0,60s. No tempo t=0,42s a diferença foi de 5% e no tempo t= 0,70s foi de 2%. Assim como no fluido não-Newtoniano as diferenças foram pequenas entre os regimes laminares e turbulentos no decorrrer do tempo. Todos os valores de tensão de cisalhamento com cateter no regime turbulento também se apresentaram menores que os valores laminares com cateter. No entanto, as diferenças foram muito pequenas.

No que se refere às diferenças observadas entre os regimes turbulentos com e sem cateter, no tempo t=0,42s a diferença entre os escomentos foi de 34% (0,47 Pa com cateter e 0,31 Pa sem cateter) e no tempo t=0,7s (0,37 Pa com cateter e 0,32 Pa sem cateter) as diferença foram de 14%. Todos os valores no decorrer do tempo apresentaram a tensão de cisalhamento mais alta com a presença do cateter do que quando ausente. As diferenças entre os regimes turbulentos foram muito próximas aos regimes laminares com e sem cateter. As maiores diferenças encontradas entre os regimes turbulentos com e sem cateter também foram no tempo t= 0,50s. O escoamento em que o cateter estava presente apresentou uma tensão de cisalhamento 37% maior quando comparado ao escoamento em que o cateter não estava presente (0,31 Pa sem o cateter e 0,49 Pa com o cateter).

Analisou-se ainda, os valores de velocidade no fluido não-Newtoniano laminar e turbulento. A FIG 4.8 apresenta o perfil de velocidade no plano, do fluido não-Newtoniano.

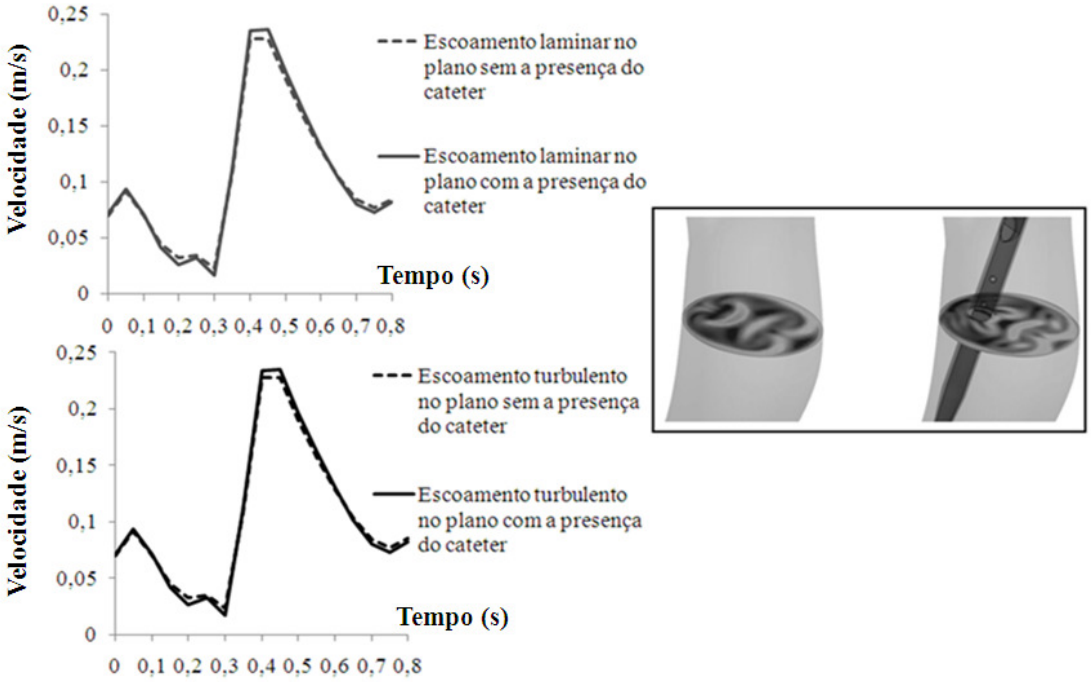


FIGURA 4.8: Distribuição do perfil de velocidade nos regimes laminares e turbulentos num fluido não-Newtoniano. A imagem apresenta o plano em que os resultados foram obtidos.

Quando se compara o escoamento em regime laminar com a presença e ausência do cateter inserido na veia no tempo t=0,30s a diferença entre as velocidades foi de 26%, sendo neste caso a velocidade com cateter de 0,017 m/s e sem cateter de 0,023 m/s. No tempo de 0,70s a diferença entre as velocidades foi de 11%. Sendo a velocidade com cateter de 0,08 m/s e sem cateter de 0,09 m/s.

No tempo t=0,30s os escomentos nos regimes turbulentos e laminares com cateter, apresentaram velocidades nos valores de 0,02 m/s com uma diferença de cerca de 1% entre elas. No tempo de 0,70s as velocidades foram de 0,08m/s com uma diferença mínima de 1% entre elas.

A diferença de velocidade entre os regimes turbulentos com e sem cateter foram de 33% no tempo t=0,30s (0,024m/s com cateter e 0,016 sem cateter) e no tempo t=0,70s a diferença foi de 4% (0,081m/s com cateter e 0,084 m/s sem cateter).

No escoamento em regime laminar sem cateter a mediana de velocidade foi de 0,084 (IQR: 0,06-0,129) m/s e, na presença do cateter a mediana foi de 0,082 (IQR: 0,07-0,132) m/s. No tempo de 0

a 0,1s e de 0,4 a 0,65s os valores da velocidade com a presença do cateter aumentaram como observado na FIG 4.8. Nos demais tempos as velocidades diminuíram com a presença do CVC.

No escoamento em regime turbulento não-Newtoniano, a mediana de velocidade para o escoamento sem cateter foi de 0,085 (IQR:0,06-0,013) m/s e, com cateter foi de 0,081 (IQR: 0,07-0,013) m/s.

No estudo de LONYAI *et al.* (2010), em que simulou numericamente o escoamento no interior das veias quando na introdução do cateter de marcapasso, observou-se que, em algumas regiões da veia inonimada, próximo à veia cava, as velocidades dobraram (0,15 m/s sem marcapasso e 0,30 m/s com a presença do marcapasso). Entretanto, quando o marcapasso se aproximava em direção à parede do vaso, a velocidade reduzia quando comparado a uma veia sem marcapasso.

Resumindo, quando os cateteres foram inseridos na veia cava, numa região distante da parede do vaso, as velocidades aumentaram de 25 a 50% e, quando aproximava os valores de velocidade reduziram quando comparados à veia sem o cateter (LONYAI *et al.,* 2010). Contrario aos resultados desse estudo, as velocidades no presente estudo foram variaveis no decorrer do tempo, apresentando valores aumentados ou diminuidos na presença do cateter dependendo das condições de sístole e diástole cardíaca.

É interessante descrever as variações de valores das tensões de cisalhamento, velocidade e pressão no decorer do escoamento na jugular direita com a presença e ausência do cateter. Para isso, inseriram-se diversos planos no interior da veia jugular direita nos tempos t=0,30s e t=0,70s, considerando os fluidos newtonianos e não-Newtonianos. A FIG 4.9 apresenta a velocidade num fluido não-Newtoniano e a disposição dos 16 planos inseridos no interior da veia.

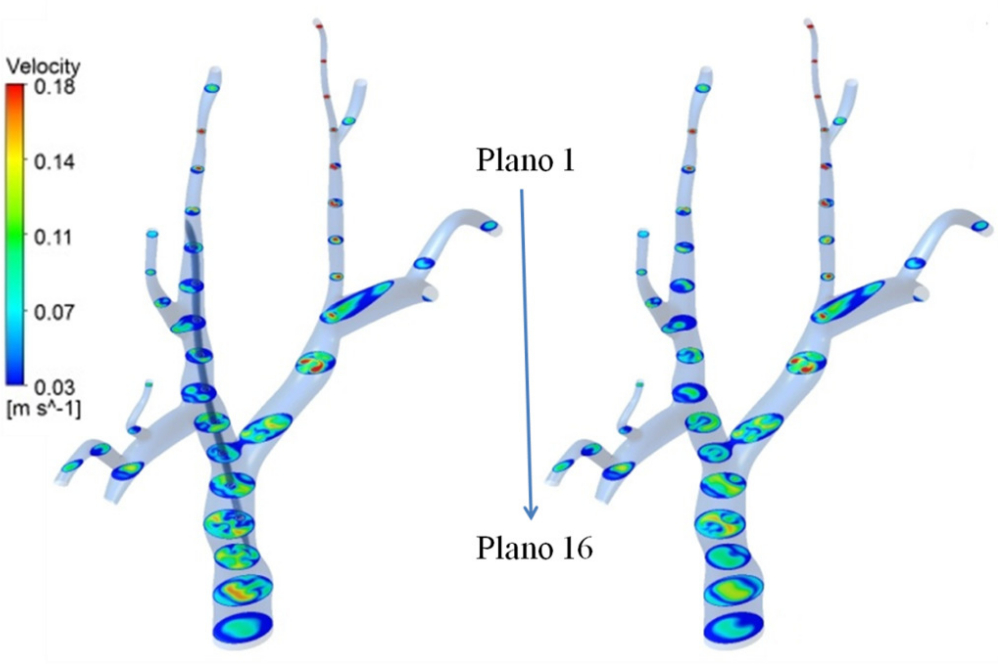


FIGURA 4.9: Distribuição da velocidade no decorrer dos planos inseridos na veia com e sem cateter no fluido não-Newtoniano.

No que se refere ao escoamento em regime laminar *não-Newtoniano* (t=0,30s), a mediana dos valores de tensão de cisalhamento foi de 0,19 Pa com valor mínimo de 0,15 Pa (plano 8) e máximo de 0,49Pa (plano 15) para o escoamento sem cateter (TAB 4.1). No escoamento em regime laminar com cateter, a mediana também foi de 0,19 Pa , valores mínimos (0,16 Pa) no plano 8 e máximo de 0,50Pa (plano15). A diferença entre os escoamentos nos planos inseridos no interior da veia jugular direita com a presença e ausência do cateter, alcançaram o máximo de 10%. No escoamento em regime turbulento essas diferenças alcançaram a mesma porcentagem. Quanto à diferença entre os ecoamentos emr egimes laminares e turbulentos quando na presença e na ausência do cateter, as diferenças entre as tensões nos planos alcançaram o máximo de 5%.

No escoamento em regime laminar *newtoniano*, a mediana da tensão de cisalhamento no tempo t=0,30s com e sem cateter foi 0,11 Pa com valor mínimo de 0,05 Pa para o escoamento sem cateter e de 0,38Pa para o valor máximo (TAB 4.2). Para o escoamento com cateter o valor mínimo da tensão foi de 0,07 Pa e máximo de 0,38 Pa. Os valores de tensão de cisalhamento apresentaram-se menores no fluido newtoniano quando comparado ao não-Newtoniano.

TABELA 4.1

Distribuição da tensão de cisalhamento nos planos inseridos no interior da veia jugular interna direita nos regimes laminares e turbulentos não-Newtoniano.

Planos (t=0,30s)	**Fluido não-Newtoniano**			
	Regime laminar		**Regime turbulento**	
	Sem cateter	**Com cateter**	**Sem cateter**	**Com cateter**
	Tensão de cisalhamento (Pa)		**Tensão de cisalhamento (Pa)**	
1	0,17	0,16	0,17	0,16
2	0,18	0,19	0,18	0,19
3	0,18	0,20	0,18	0,20
4	0,19	0,19	0,20	0,19
5	0,22	0,20	0,22	0,19
6	0,19	0,18	0,19	0,18
7	0,23	0,23	0,23	0,22
8	0,15	0,16	0,16	0,16
9	0,18	0,17	0,18	0,17
10	0,16	0,17	0,16	0,16
11	0,19	0,18	0,19	0,18
12	0,28	0,26	0,27	0,25
13	0,30	0,31	0,29	0,30
14	0,40	0,38	0,39	0,37
15	0,49	0,50	0,48	0,49
16	0,29	0,29	0,28	0,28

TABELA 4.2

Distribuição da tensão de cisalhamento nos planos inseridos no interior da veia jugular interna direita nos regimes laminares e turbulentos newtoniano.

Planos (t=0,30s)	Fluido Newtoniano			
	Regime laminar		Regime turbulento	
	Sem cateter	Com cateter	Sem cateter	Com cateter
	Tensão de cisalhamento (Pa)		Tensão de cisalhamento (Pa)	
1	0,05	0,07	0,05	0,07
2	0,08	0,09	0,08	0,09
3	0,11	0,11	0,10	0,11
4	0,10	0,12	0,10	0,11
5	0,11	0,12	0,11	0,12
6	0,09	0,09	0,08	0,09
7	0,16	0,15	0,15	0,14
8	0,09	0,09	0,08	0,08
9	0,10	0,11	0,10	0,10
10	0,11	0,09	0,11	0,09
11	0,13	0,12	0,13	0,11
12	0,21	0,18	0,20	0,17
13	0,19	0,20	0,18	0,18
14	0,33	0,31	0,32	0,30
15	0,38	0,38	0,35	0,35
16	0,20	0,20	0,18	0,18

No que se refere à taxa de deformação no escoamento em regime laminar *não-Newtoniano* (t=0,30s), observou-se uma variação menor que 4,5% quando se compara o escoamento na presença e na ausência do cateter. Entretanto no plano 4 obteve-se uma diferença de 7%. A mediana dos dois escoamentos foi de 11,5 s^{-1}, com valores mínimos de 7,5 s^{-1} e máximo de 53 s^{-1} quando na presença e na ausência do cateter (t=0,30s).

No escoamento em regime laminar *newtoniano*, a taxa de deformação no tempo t=30 s teve uma variação média de 9%. Por outro lado, os valores de taxa de deformação apresentaram-se maiores, com uma mediana de 19 s^{-1} para ambos os escoamentos, com valores mínimos de 9 s^{-1} e máximo de 63 s^{-1} para o escoamento sem cateter e mínimo de 11 s^{-1} e máximo de 64 s^{-1} para o escoamanto com cateter.

Quanto à mediana de valores de velocidade no decorrer dos planos, o fluido newtoniano apresentou maiores valores quando comparado ao fluido não-Newtoniano (TAB 4.3).

TABELA 4.3

Valores da mediana de velocidade entre os planos inseridos no interior da veia jugular direita nos regimes laminares e turbulentos.

Modelo **(t=0,30s)**	**Regime Laminar**		**Regime Turbulento**	
	Sem cateter	Com cateter	Sem cateter	Com cateter
	Velocidade(m/s) Mediana(mínimo-máximo)			Velocidade(m/s) Mediana(mínimo-máximo)
Não-newtoniano	0,014 (0,007-0,023)	0,014 (0,006 0,023)	0,014 (0,006-0,022)	0,013 (0,007 0,024)
Newtoniano	0,019 (0,013-0,029)	0,019 (0,011-0,029)	0,019 (0,011- 0,029)	0,018(0,011-0,028)

É interessante observar que, os valores de pressão entre os regimes laminares dos fluidos *não-Newtonianos* com e sem cateter, variaram em média 0,33% no tempo t=0,30s. Além disso, diferente dos valores de velocidade e tensão de cisalhamento, as pressões do escoamento com cateter aumentaram gradativamente no deccorrer dos diversos planos. Indo de 1602 Pa no plano 1 a 2059 Pa no plano16 no tempo t=0,30s. Enquanto que no escoamento em regime laminar sem cateter, a pressão aumentou de 1602 Pa a 2037 Pa. As diferenças de pressões foram maiores entre os planos 13 e 16. Tais diferenças alcançaram percentuais que variaram de 0,9 a 1,12%.

Em concordância com esses achados o estudo de LONYAI *et al.* (2010) também apresentou diferenças mínimas na pressão quando na introdução do marcapasso no interior das veias. A maior diferença entre as pressões foi observada na veia subclávia esquerda, em que a pressão aumentou de 46 Pa para 66 Pa (diferença de 30%) quando na presença do marcapasso (LANYAI *et al.*, 2010).

No presente estudo, as maiores diferenças estavam no interior da veia cava, porém, alcançou diferença máxima de 1,12% quando na introdução do cateter. No tempo t=0,70s a pressão variou de 793 Pa a 861Pa no regime laminar com cateter e de 793Pa a 850 Pa no escoamento sem cateter.

No fluido *newtoniano* em regime laminar (tempo t=0,30s) a pressão variou de1602 Pa no plano 1 a 2032 Pa no plano 16 no escoamento sem o cateter e de 1602 Pa a 2053 Pa no escoamento com o cateter. A diferença entre os valores de pressão nos planos com e sem cateter também foram mínimas com diferença máxima de 2% no plano16. No tempo t=0,70s a pressão variou de 799 Pa a 853Pa no escoamento com cateter e de 799 Pa a 837 Pa no escoamento sem cateter.

4.2) Estudo numérico do escoamento no interior da veia e no interior do CVC desobstruído e obstruído em regimes laminares

Neste subcapítulo, optou-se inicialmente por descrever o regime laminar com o cateter obstruído e desobstruído, a seguir em outro subcapitulo, discutiram-se os regimes laminares e turbulentos com a presença do cateter desobstruído e finalmente compararam-se os quatro tipos de simulação contendo os cateteres obstruídos e desobstruídos nos regimes laminares e turbulentos. As simulações foram comparadas à morfologia, deposição e conformação da fibrina no interior do trombo venoso.

No que diz respeito à simulação laminar, a FIG 4.10 compara os vetores de velocidade no interior da veia que apresentava o cateter com obtruções parciais com aquele que não apresentava obstruções.

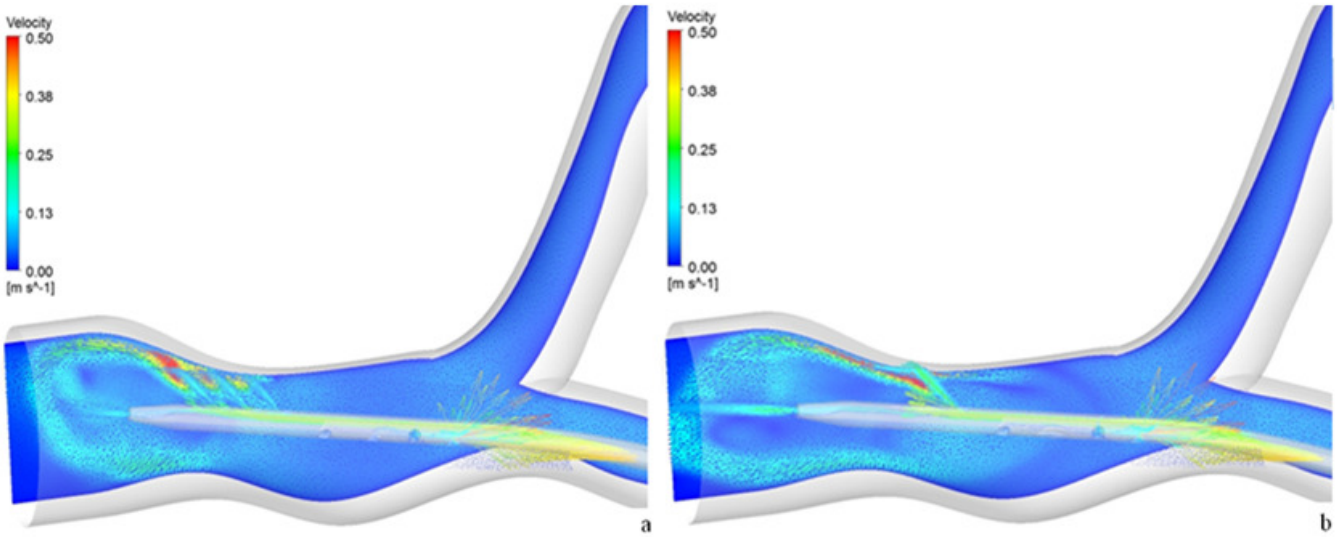


FIGURA 4.10: Perfil dos vetores de velocidade do cateter desobstruído (a) e do cateter obstruído parcialmente (b).

Observou-se um maior jato de velocidade do escoamento na ponta final do cateter na FIG. 4.10 (b) devido à obstrução parcial dos dois primeiros orifícios venosos. Pode-se observar ainda, um aumento do jato de velocidade no orifício venoso 3 no cateter que foi obstruido parcialmente. A TAB 4.4 apresenta a diferença de vazão mássica entre os orifícios de entrada e saída dos CVCs.

TABELA 4.4

Valores de vazão mássica nos orifícios de entrada e saída dos CVCs.

Orifícios	Cateter desobstruído	Cateter obstruído
	Vazão mássica (kg s^{-1})	Vazão mássica (kg s^{-1})
Central	0,0009	0,0017
Orifício venoso 3	0,0011	0,0035
Orifício arterial 4	0,0054	0,0056
Orifício arterial 3	0,0021	0,0024
Orifício arterial 1	0,0003	0,0006

No orifício final central do cateter, a vazão média no cateter obstruído apresentou-se quase duas vezes a maior quando comparado ao cateter desobstruído. No orifício venoso 3 a vazão quase que triplicou quando o cateter apresentava a obstrução parcial.

Para melhor compreensão dos vetores nos orifícios venosos, a FIG 4.11 apresenta o cateter em que os orifícios venosos estavam desobstruídos.

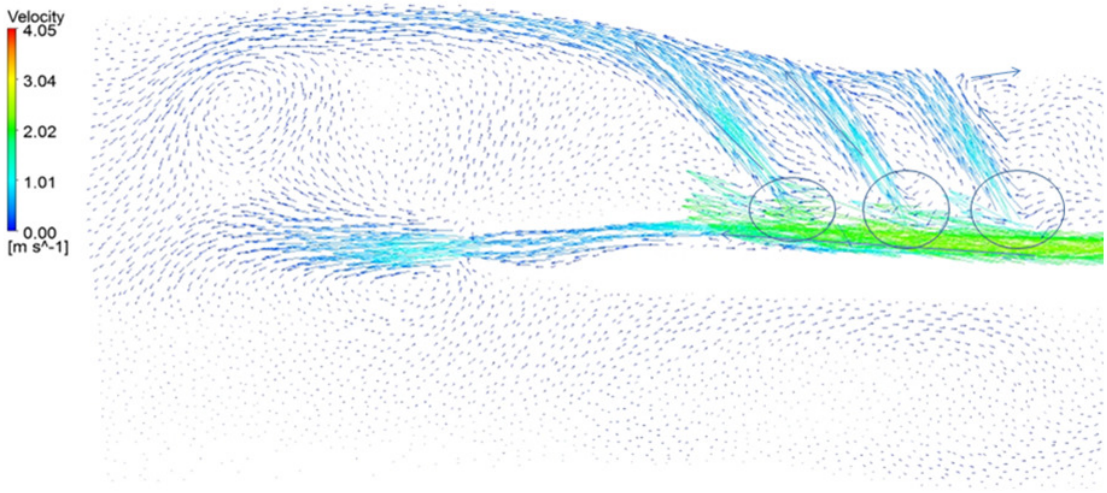


FIGURA 4.11: Vetores do perfil da velocidade nos orifícios venosos de saída do CVC desobstruído.

Observaram-se áreas de recirculação próximas aos orifícios laterais e a presença de vórtice. Sendo assim, mesmo na ausência de obtrução parcial, a presença do cateter propiciou um distúrbio no escoamento, o que faz com que propicie a adesão e agregação plaquetária. Ressalta-se que, de acordo com *National Kidney Foundation DOQI guidelines* qualquer tipo de área de recirculação que possa ocorrer em acessos venosos centrais será considerado fora dos padrões normais de funcionamento (AKRAM; ABBAS, 2011). Além disso, os CVCs possuem uma recirculação que é natural do desenho dos orifícios que contém no dispositivo. A recirculação ocorre quando o sangue retorna para o paciente por meio dos orifícios venosos e o mesmo fluxo entra de modo contínuo pelos orificios arteriais e retorna para a máquina de diálise. O sangue recircula dos orifícios de saída para os de entrada.

A recirculação fica mais evidente em alta velocidade do escoamento, sobretudo, em cateteres de hemodiálise em que contrasta a baixa velocidade das veias centrais em relação à velocidade e vazão

que chega à veia por meio dos orificios de saída. Evidências indicam que, a recirculação no acesso venoso ocorre quando a vazão do escoamento sanguíneo para o acesso ao dialisador, ou a velocidade da bomba de sangue diminuem.

Uma situação comum nesse caso é a estase venosa (AKRAM; ABBAS, 2011). Outra explicação para a recirculação em cateteres de hemodiálise seria a proximidade entre os orifícios laterais de entrada e saída do cateter, gerando distúrbios no escoamento como áreas de separação de fluxo.

Vale à pena ressaltar que, a taxa de recirculação dos CVC de hemodiálise depende do tipo de veia em que o cateter foi de inserido; no entanto, o escoamento sanguíneo, a duração da hemodiálise, o tempo de inserção do cateter, rítimo cardíaco e tipo de cateter não têm efeitos significantes na recirculação (AKRAM; ABBAS, 2011).

No que se refere ao cateter em que apresentava obstrução parcial, a FIG 4.12 apresenta os vetores que, indicaram a presença de vórtices na porção distal da ponta do cateter e áreas de recirculação na região próxima aos orifícios laterais. Como a vazão volumétrica e a velocidade apresentam-se maiores neste orifício a recirculação nesta região é maior tanto próximo ao orifício quanto nas proximidades da parede da veia.

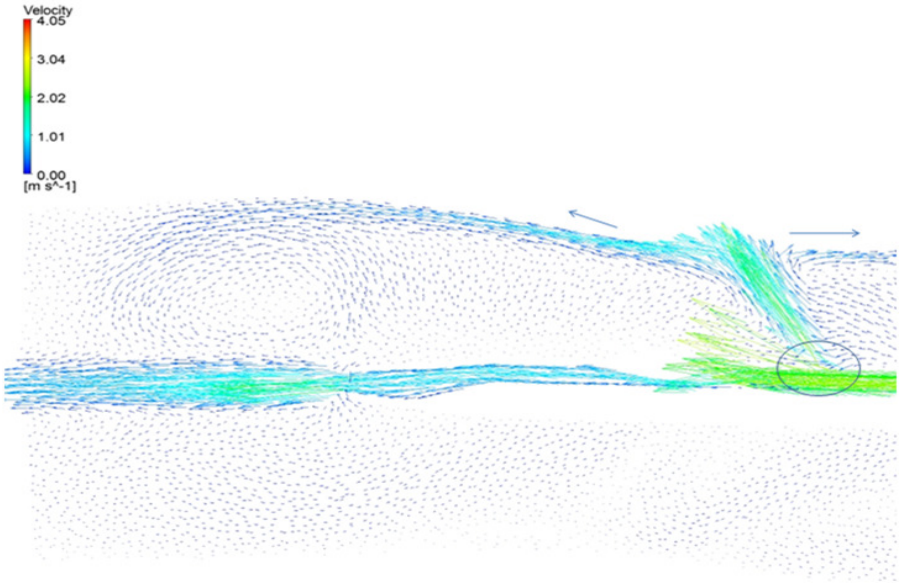


FIGURA 4.12: Vetores do perfil da velocidade nos orifícios venosos de saída do CVC desobstruído.

No que se refere à tensão de cisalhamento no terceito orifício venoso, a FIG 4.13 apresenta a fotografia dos dois primeiros orifícios venosos obstruídos e o terceiro orificio desobstruído. A outra imagem fotográfica apresenta a foto da ponta do cateter com ausência de obstrução nos orifícios venosos. A FIG 4.13 (a) apresenta a tensão de cisalhamento do cateter obstruído parcialmente e a FIG 4.13(b) do cateter desobstruído, no tempo t=0,4s.

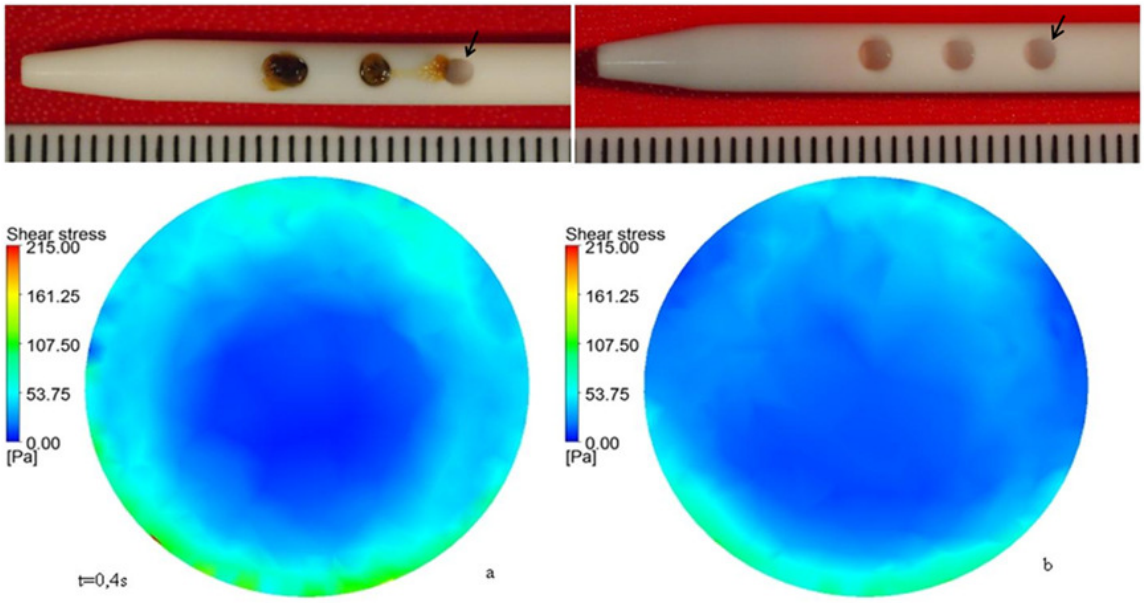


FIGURA 4.13: Tensão de cisalhamento no orificio venoso obstruído (a) e desobstruído (b). As setas inseridas nas fotografias indicam os orifícios em que foi feito o estudo numérico.

As micrografias da FIG 4.14 apresentam as variações da disposição da fibrina no interior do tecido trombótico. A FIG 4.14 (a) apresenta a fibrina ligada à parede do cateter, disposta longitudinalmente e paralela à parede do orifício venoso formando uma placa adsorvida pelo polímero.

A FIG 4.14 (b) apresenta a disposição da fibrina na região externa do cateter em contato com a circulação sanguínea. Por outro lado, a FIG 4.14 (c), a fibrina apresenta-se disposta de forma mais paralela, lisa e menos irregular, uma vez que representa a imagem das camadas de fibras no interior do lúmen do cateter, submetida à tensão de cisalhamento e velocidade do escoamento praticamente, na região interna ao cateter.

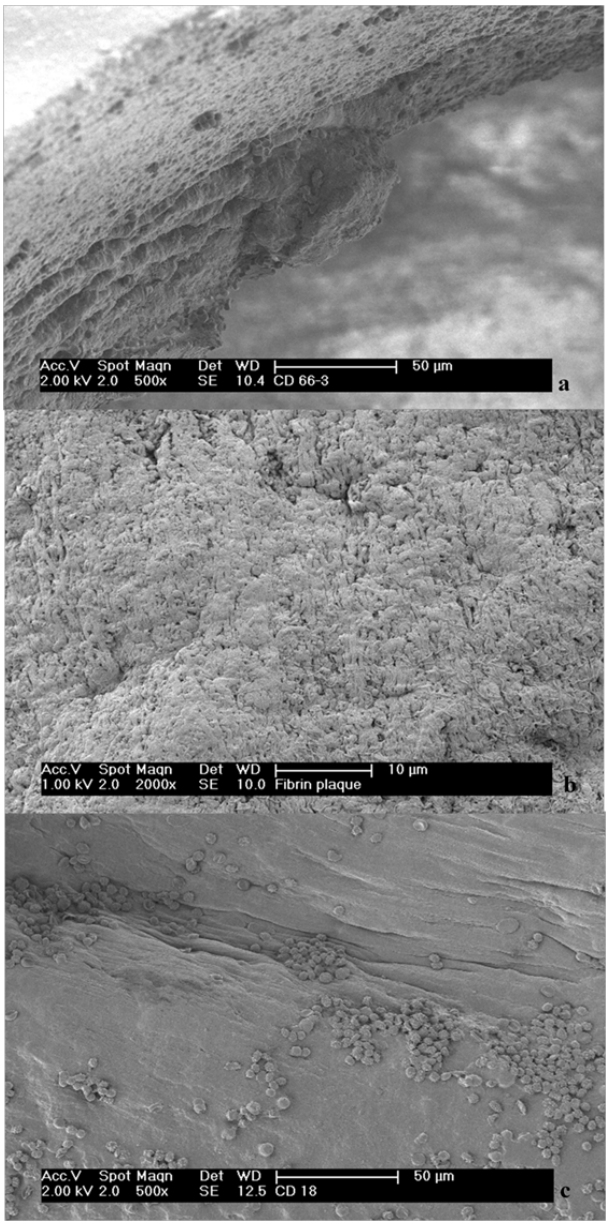


FIGURA 4.14: Micrografias das camadas de fibrina ligadas à parede interna do orifício do CVC (a). Fibrina na região externa do trombo (b). Fibrina na região interna do lúmen do CVC (c). Magnificação original 500x, 2000x.

É importante destacar que, o contato do cateter com o sangue e subsequente adsorção de proteínas plasmáticas na superfície desse material conduz, em menos de 24 horas, a uma rede constituída de agregados de fibrina e de plaquetas envolvendo o interior de toda a parede do cateter (DWYER, 2008; KNUTTINEN *et al.*, 2009; WILLICOMBE *et al.*, 2010; KONSTANTINOU *et al.*,

2012). A fibrina aderida à superfície polimérica ativa a agregação de plaquetas, coagulação (extrínseca e intrínseca), polimerização dos monômeros de fibrina a partir do fibrinogênio (fator de coagulação presente no plasma) e ligações cruzadas das fibras para formar a rede densa de fibrina (THEVENOT *et al.*, 2008; LORD, 2011; WANG *et al.*, 2012).

Na FIG 4.14 observou-se um amontoado de fibras densas heterogêneas dispostas de forma irregular que recobrem plaquetas e eritrócitos em toda a superfície externa do trombo. Neste estudo, a estrutura heterogênea do trombo visto nas imagens de MEV, foi comparada à complexidade do escoamento venoso quando na presença do cateter. Isto é, escoamento reverso, vórtices e altos valores de tensão de cisalhamento são cruciais para a disposição assimétrica da fibrina no interior do trombo.

Dessa forma, diferente dos trombos de estrutura homogênea composta predominantemente por eritrócitos e esparsa regiões de fibrina e plaquetas, descrito de estudos *in vitro* ou de animais de laboratório (LIEBESKIND *et al.*, 2011; USCIDA *et al.*, 2011; MAZUR, 2013); o trombo venoso no presente estudo foi descrito como um amontoado de fibrinas, classificados como *placa de fibrinas*, *rede de fibrinas* e *fibras de fibrinas* que estão distribuídas ao longo do todo o volume do trombo. Além disso, o distúrbio no escoamento e variações das forças hemodinâmicas (pressão e tensão de cisalhamento) afeta a constituição do trombo e orientação das fibras como um todo.

No presente estudo, as fibras seguem a direção do escoamento, no entanto, vale lembrar que, a sua direção é perturbada (recirculação, separação de escoamento e pontos de estagnação) devido à presença do cateter e dos orifícios laterais. Sendo assim, as fibras se distribuem de forma randomizada, mesmo sob condições de alta velocidade e de taxa de deformação. Tais achados, apresentaram-se diferente do estudo de GERSH *et al.* (2011) realizado *in vitro*, para analisar o alinhamento das fibras de fibrina quando em presença de escoamento sanguíneo. O estudo concluiu que, quanto maiores as velocidades do escoamento e as taxas de deformação, menos randomizadas as fibras apresentaram e tenderam a seguir a direção vetorial paralela do escoamento.

O perfil de velocidade do orifício venoso do cateter sem obstrução está apresentado na FIG 4.15 (a) e 4.15 (c) e o perfil da velocidade do cateter com obstrução está apresentado na FIG 4.15(c) e 4.15 (d).

Observa-se que, há um aumento de velocidade, principalmente na região central do trombo quando o cateter apresenta obstrução parcial.

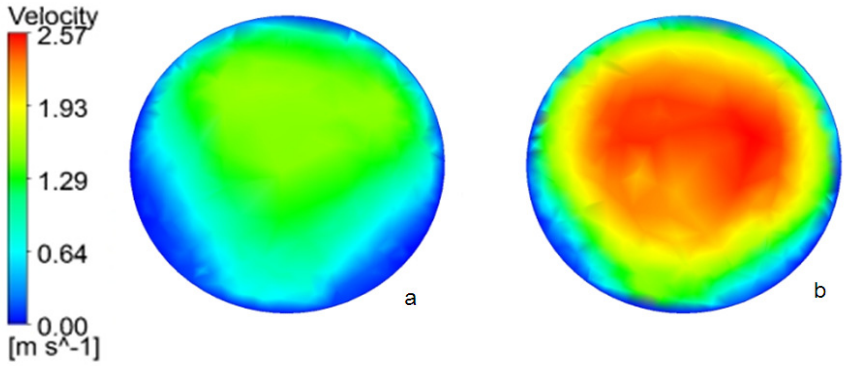


FIGURA 4.15: Velocidade no orifício venoso do cateter desobstruido (a) e do cateter obstruído (b) no tempo t=0,4s.

O GRA 4.1 (a) apresenta o perfil de velocidade do orificio venoso do cateter desobstruído e o GRA 4.1 (b) apresenta o perfil de velocidade do orifício venoso do cateter obstruído.

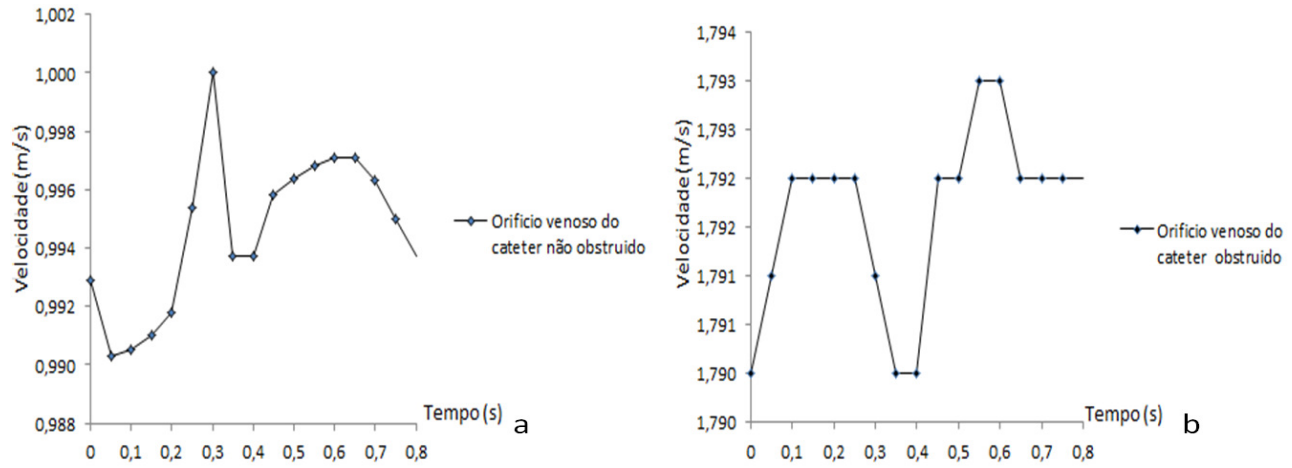


GRÁFICO 4.1: Perfil de velocidade do orificio venoso do cateter desobstruído (a). Perfil de velocidade do orifício venoso do cateter obstruído (b).

Um estudo de caso, realizado por MAZUR *et al.* (2012) avaliou em MEV um trombo proveniente de trombose venosa profunda retirado de uma paciente. Concluiu-se que, devido à alta velocidade do fluxo pulmonar, os trombos em artérias pulmonares apresentaram maior quantidade de fibrina e menor número de eritrócitos em comparação ao trombo atrial. No presente estudo, o aumento da velocidade, também fez com que as plaquetas permanecessem concentradas próximas à parede do orifício venoso e que fosse encontrado um menor número de eritrócitos nesta região, confirmado pelos estudos histológicos e de MEV.

Dessa forma, o trombo resultante final será uma estrutura heterogênea, porém formado por grande quantidade de camadas de fibrina e plaquetas alternadas próxima à parede do vaso, e camadas de fibrina com eritrócitos em maior quantidade no centro do trombo.

Inseriram-se três planos no interior do cateter venoso na região anterior, mediana e posterior à obstrução dos dois primeiros orifícios venosos. A FIG 4.16 apresenta a pressão nos respectivos planos. No cateter em que não possuía obstrução os planos foram inseridos na mesma região do cateter obstruído para possibilitar a comparação.

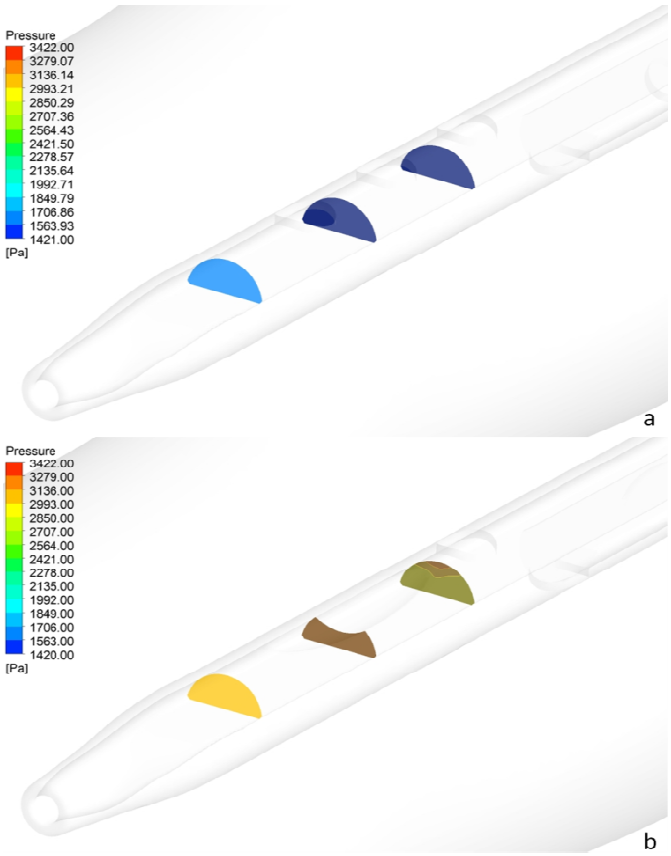


FIGURA 4.16: Planos inseridos na região de obstrução venosa. Imagens (a) e (b) apresentam a pressão do cateter desobstruído e obstruído parcialmente respectivamente.

A FIG 4.17 apresenta a comparação dos valores de pressão para o cateter sem obstrução parcial (FIG 4.17a) e com obstrução parcial (FIG 4.17 b) no interior do lúmen.

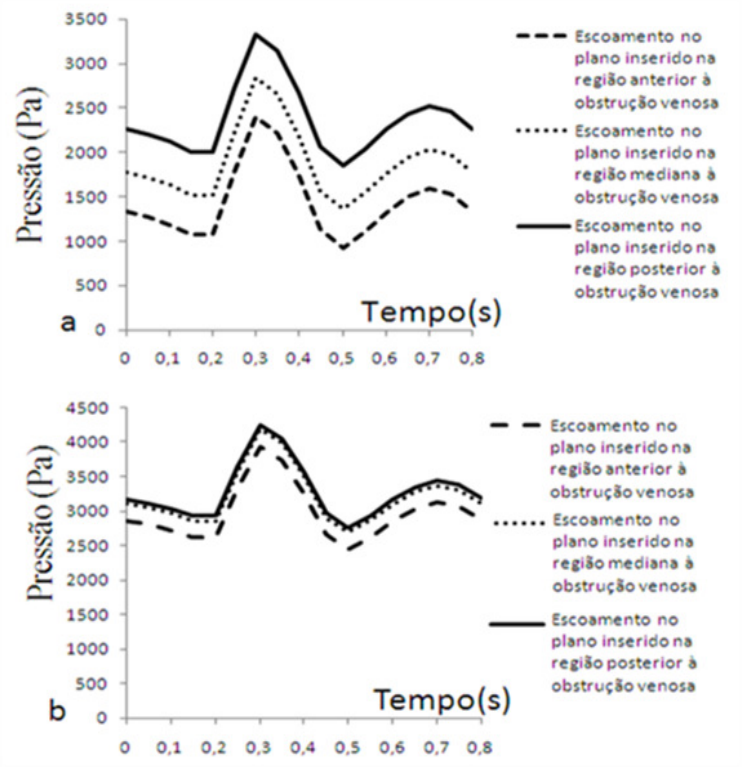


FIGURA 4.17: Distribuição da pressão no cateter desobstruído (a) e no cateter obstruído (b) nos escoamentos em regimes laminares no interior do lúmen do cateter.

As pressões nos três planos apresentaram-se maiores no cateter com obstrução parcial. A mediana de valores do cateter obstruído para o plano inserido após a obstrução foi de 3106 (IQR: 2900-3369) Pa enquanto que para o cateter sem obstrução a mediana de valores foi de 2262 (IQR: 2057-2524) Pa. Tais valores indicam a presença de um jato na jusante central do cateter de maior pressão na parede das células endoteliais da veia quando o cateter está obstruído. Esta alteração na hemodinâmica sanguínea possibilita a lesão de células endoteliais que rapidamente levará à adesão plaquetaria e ativação dos fatores de coagulação, contribuindo para a aceleração de formação de bainha ao redor do cateter e dos trombos.

Quanto ao plano inserido na região anterior à obstrução, a mediana de pressão foi de 2862 (IQR: 2628-3125) Pa para o cateter obstruído e a mediana para o cateter não obstruído foi de 1331 (IQR: 1128-1595) Pa.

A mediana dos valores do plano inserido na região mediana da obstrução foi de 3175 (IQR: 2967-3437) Pa para o cateter obstruído. Para o cateter que não possuía obstrução a mediana foi de 1772 (IQR:1567-2035)Pa.

Fez-se uma análise de velocidade nos orifícios arteriais como mostra a FIG 4.18.

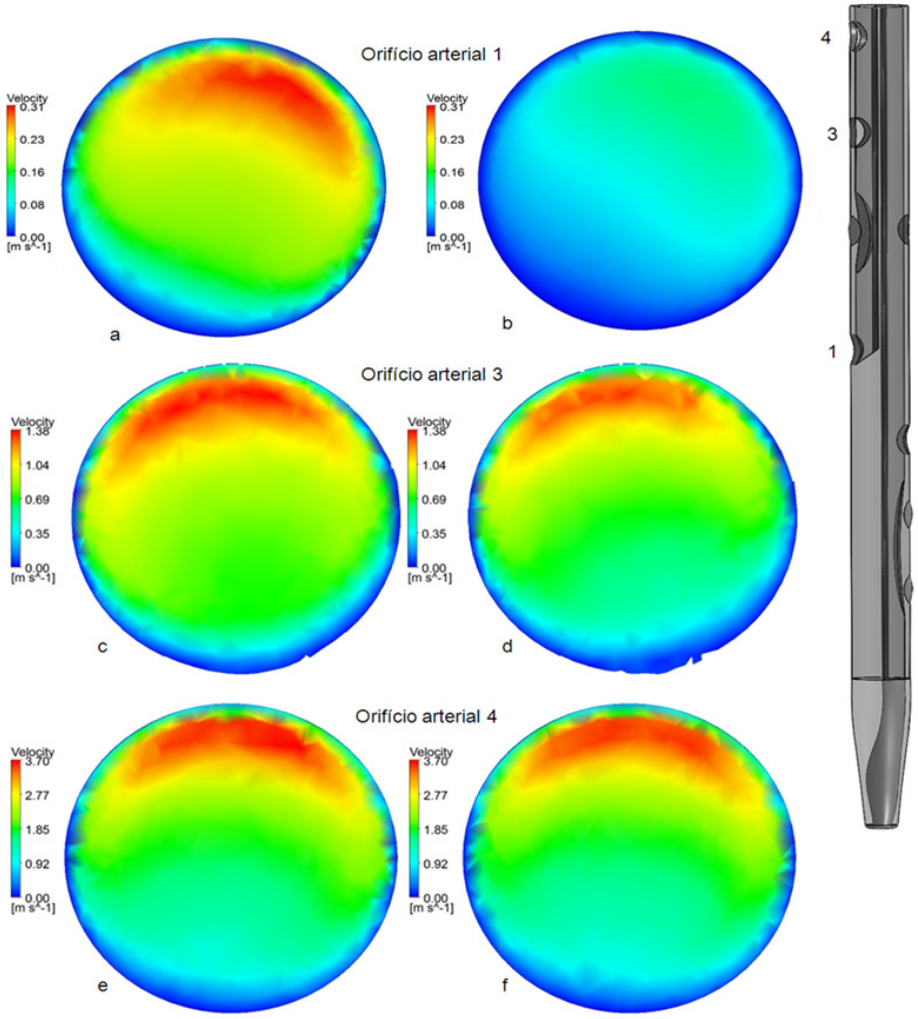


FIGURA 4.18: Distribuição dos valores de velocidade no orifício arterial 1, 3 e 4 com obstrução (a,c,e) e sem obstrução (b,d,f). Geometria do CVC, apresentando os orifícios arteriais 1,3 e 4.

No que se refere ao orifício central da ponta do cateter, a FIG 4.19 apresenta o contorno da velocidade.

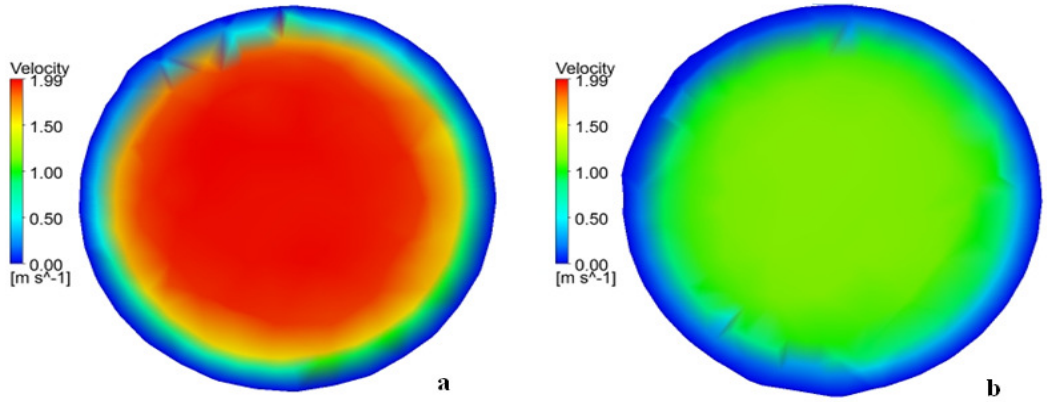


FIGURA 4.19: Distribuição dos valores de velocidade no orifício central do cateter com obstrução (a) e sem obstrução (b).

Os valores de velocidades maiores no cateter obstruído propiciam a formação de jatos maiores nos orifícios de saída e, consequentemente maiores forças mecânicas nas células. Um maior estímulo mecânico nas células pode estimular a ativação de plaquetas devido à destruição de células endoteliais (PENNATI *et al.*, 2010; PARK, 2012). Um estudo comparou o desempenho de cateteres angiográficos na ejeção de líquidos de contraste em veia cefálica e anticubital quando composto por orifícios laterais e quando somente composto pelo orifício padrão final na ponta do cateter (WEBER *et al.*, 2009).

Simulações numéricas foram feitas e inseriu-se o cateter em diâmetros variáveis de vasos (3, 5 e 7 mm) construído no programa Solid Works® (WEBER *et al.*, 2009). Simularam-se cateteres sem orifícios laterais e cateteres contendo dois, quatro e oito orifícios num escoamento laminar e turbulento em regime permanente. (WEBER *et al.*, 2009). Apesar da abordagem diversa desse estudo, e da não obstrução no interior do cateter estudado, alguns achados apresentaram em acordo com o presente estudo. A introdução de orifícios laterais resultou na diminuição do jato de contraste. Isto é, a velocidade do escoamento que sai da ponta do cateter diminui com o aumento de orifícios laterais. No caso de um vaso de 3 mm de diâmetro,os cateteres com dois orifícios laterais a velocidade foi de 0,91 m/s, naquele de quatro orifícios a velocidade foi de 0,85m/s e no cateter com oito orifícios laterais a velocidade foi de 0,75 m/s (WEBER *et al.*, 2009).

No presente estudo, os orifícios obstruídos propiciaram um aumento da velocidade, pressão e da tensão de cisalhamento da ponta do cateter, indicando que, quanto maior o número de orificios livres, funcionantes, menor será valores de velocidade e pressão que são ejetados dos orifícios de saída. Interessante comentar que, a média da tensão de cisalhamento no vaso diminui com o aumento de orifícios laterais e varia com a posição do cateter no interior do vaso (centrado no lúmen, ponta do cateter obliqua na parede do vaso ou excêntrico ao vaso, paralela à parede) (WEBER *et al.*, 2009).

Sendo assim, valores de tensão de cisalhamento, também poderão variar com a posição em que se encontram nos pacientes, uma vez que, pacientes na posição em decúbito dorsal podem apresentar uma tensão de cisalhamento diferente do quando permancem na posição supina. Observou-se ainda que, cateteres que apresentavam somente um único orifício central a velocidade máxima ocorreu na ponta do cateter, o qual resultou em alta tensão de cisalhamento na parede do vaso (WEBER *et al.*, 2009). Consequentemente, quando a ponta do cateter estiver apontando oblicamente para a parede do vaso, resultará numa alta tensão de cisalhamento nas células endoteliais.

Ainda em acordo com o estudo de WEBER *et al.* (2009), encontrou-se a presença de vórtice no escoamento em todos os tipos de cateteres, visto como áreas circulares de escoamento reverso, sobretudo, próximas aos orifícios laterais nos regimes laminares e turbulentos. Neste estudo, como visto nas FIGs 4.11 e 4.12, também apareceu vórtices e àreas de recirculação próxima aos orifícios laterais de saída.

A fim de entender a dinâmica da pressão e da velocidade no interior do cateter a FIG 4.20 apresenta os valores de pressão para o cateter obstruído FIG 4.20 (a) e para aquele em que não possuía uma obstrução arterial FIG 4.20 (b).

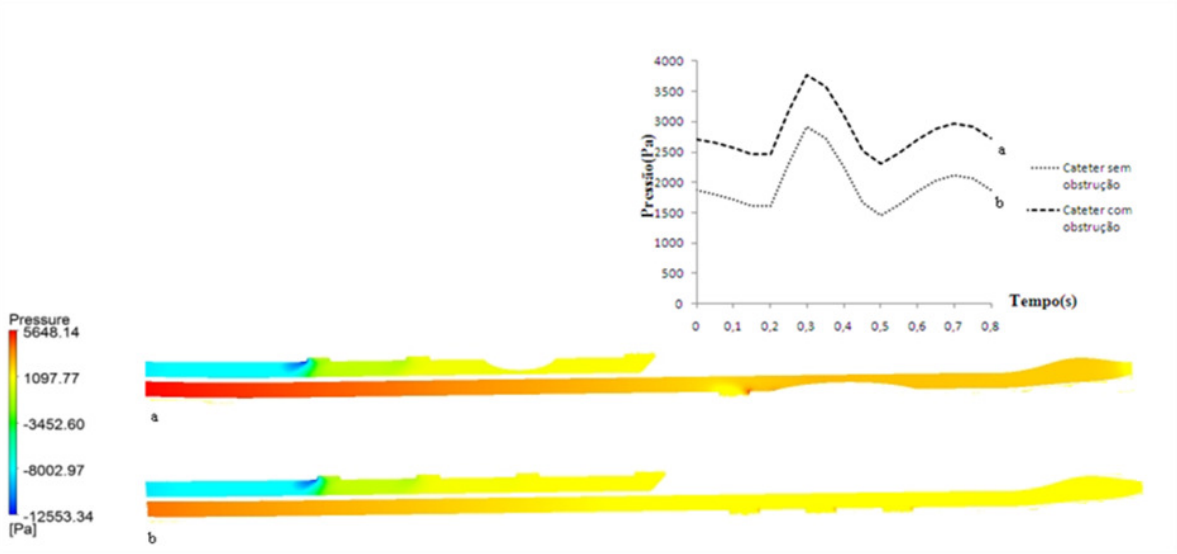


FIGURA 4.20: Distribuição dos valores de presssão no cateter com obstrução arterial e venosa (a). Valores de pressão do cateter desobstruído (b). O gráfico apresenta a variação media de pressão no interior do cateter.

Observou-se que, em ambos os cateteres ocorre uma queda de pressão no decorrer da sua extensão até que o escoamento chegue à região da ponta do cateter. Os valores de pressão no cateter que foi obstruído apresentaram-se maiores quando comparados aqueles sem obstrução. A mediana de valores para o cateter obstruído foi de 2713 (2510-2974) Pa. A mediana de valores para o cateter sem obstrução foi de 1865 (1662-2124) Pa.

A FIG 4.21 apresenta a variação da velocidade no interior do cateter venoso com e sem obstrução.

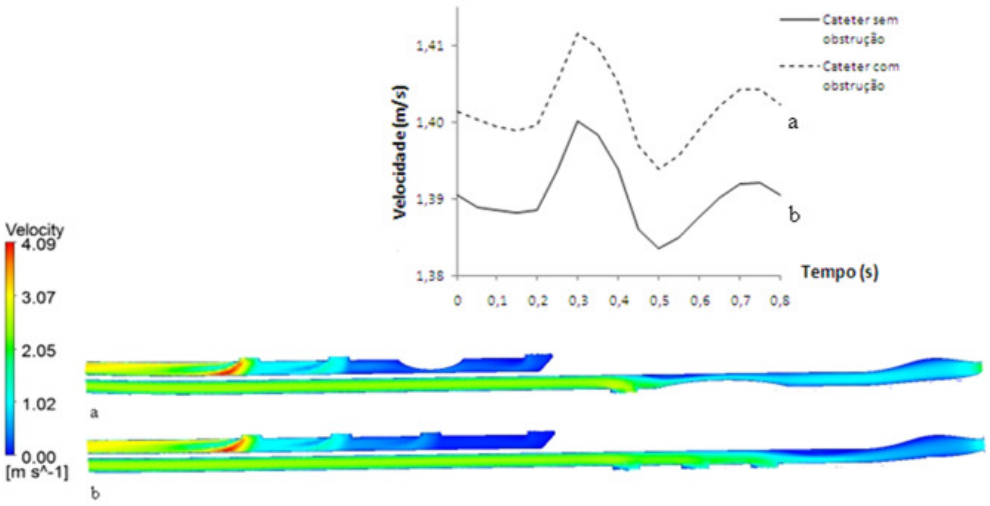


FIGURA 4.21: Distribuição dos valores de velocidade no interior do lúmen do cateter com obstrução arterial e venosa (a) e do cateter desobstruído (b). Gráfico dos valores de velocidade no decorre da extensão do cateter.

Os valores médios de velocidade do cateter com obstrução apresentaram-se um pouco maiores quando comparadas ao cateter sem obstrução (de 1,39m/s para 1,41m/s). Vale a pena ressaltar que, os valores médios de vazão na extensão do cateter foram de 0,0007 kg s^{-1} para o cateter obstruído e 0,0014 kg s^{-1} para o cateter sem obstrução. Observou-se assim, uma diminuição da vazão quando em presença de obstrução no cateter.

Para entender o escoamento no interior da veia, inseriram-se três planos invertidos (plano que passa pelo cateter, mas os valores dos planos obtidos são somente externos ao cateter). Os maiores valores de velocidade foram encontrados no plano que foi inserido na região de obstrução dos orifícios venosos, seguido daquele inserido na ponta do cateter e os menores valores de velocidades no plano, foram aqueles inseridos na região de obstrução arterial. A FIG 4.22 ilustra a localização dos planos inseridos no cateter.

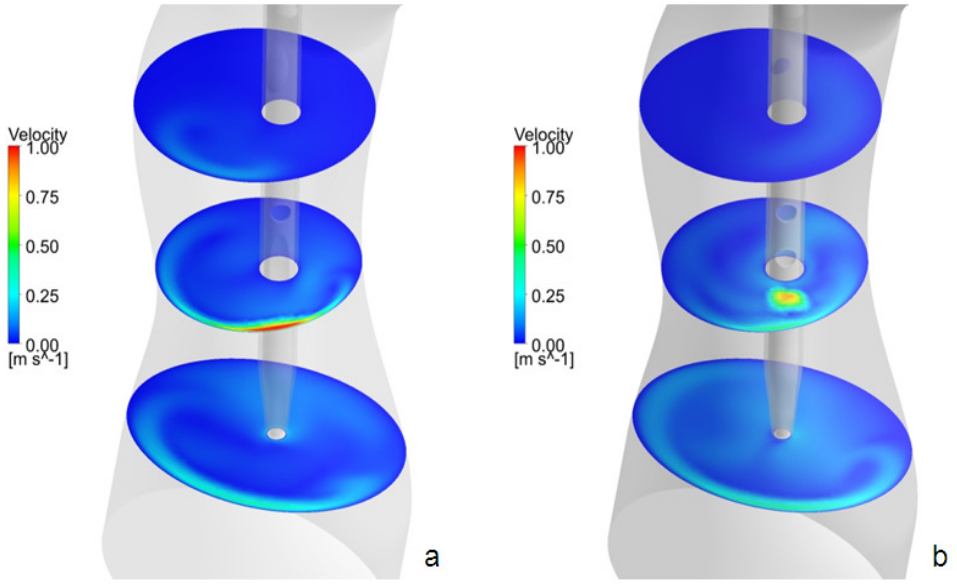


FIGURA 4.22: Planos invertidos inseridos na região da ponta do cateter. Cateter obstruído (a) e desobstruído (b).

No plano inserido na ponta do cateter o perfil do escoamento apresentado no GRA 4.2 se mantem um perfil de velocidade mais estável na presença de obstrução do cateter, mediana de 0,075 (0,064-0,082) m/s . No cateter sem obstrução, apresentou uma mediana de 0,074 (0,069-0,083)m/s.

Pode-se inferir que a presença do cateter neste plano, praticamente não modificou os valores de velocidade.

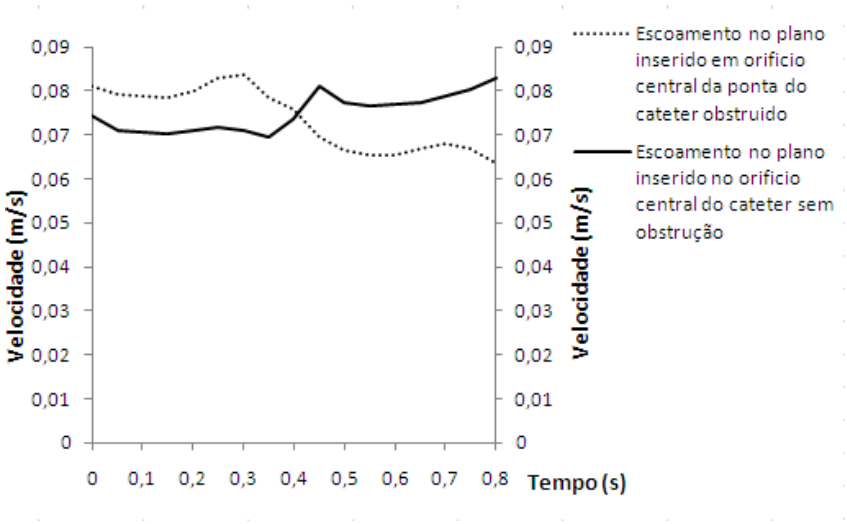


GRÁFICO 4.2: Distribuição da velocidade no plano invertido inserido na região externa da ponta do cateter.

A FIG 4.23 apresenta a imagem do perfil da velocidade no plano invertido que foi inserido na ponta do cateter no tempo t=0,4s.

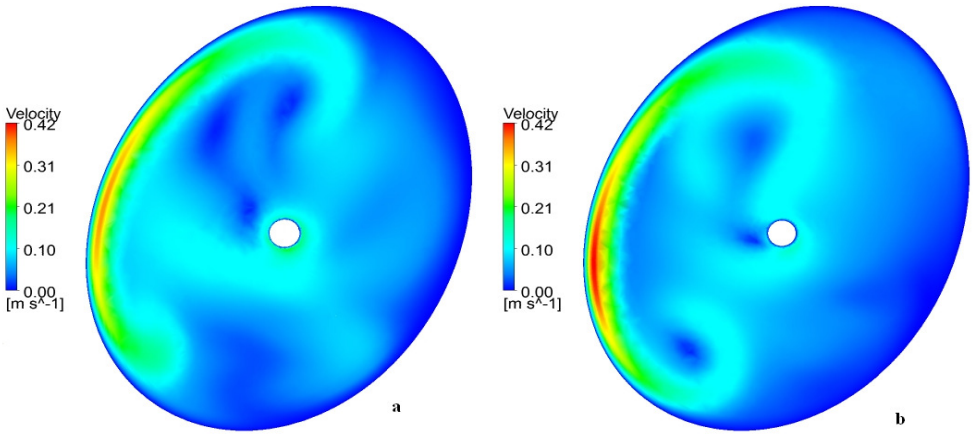


FIGURA 4.23: Distribuição da velocidade no plano invertido inserido na região da ponta do cateter no tempo t=0,4s. Cateter obstruído (a) e desobstruído(b).

Observou-se a presença de um vórtice mais desenvolvido no cateter em que não continha nenhuma obstrução em seu interior. Consequentemente em ambos os cateteres, independente da presença ou ausência de obstrução, a presença do vórtice na região da ponta do cateter propiciará a

ativação das células subendoteliais e consequentemente da cascata de coagulação. No tempo t= 0,4s, a velocidade média foi de 0,075 (0,00001-0,42) m/s. No tempo t=0,7 s a velocidade média foi de 0,068 (0,00002-0,34) m/s. A FIG 4.24 apresenta a distribuição da velocidade no tempo t=0,7s.

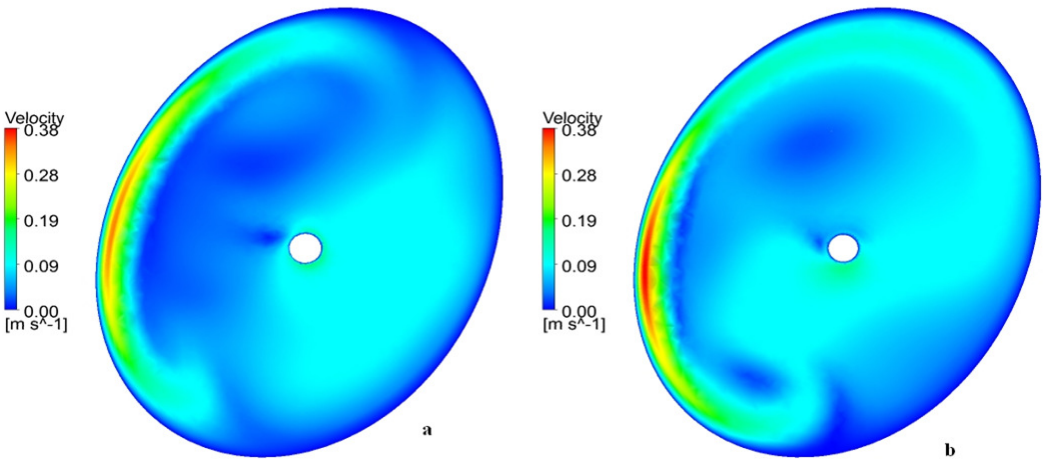


FIGURA 4.24: Distribuição da velocidade no plano inserido na região da ponta do cateter no tempo t=0,7s. Cateter obstruído (a) e desobstruído(b).

No que se refere à tensão de cisalhamento, o cateter obstruído apresentou uma média de 0,53 ±0,02 Pa e o desobstruído apresentou uma média de 0,54±0,02 Pa. O GRA 4.3 apresenta o perfil de tensão de cisalhamento no escoamento do plano inserido na ponta do cateter com e sem obstrução.

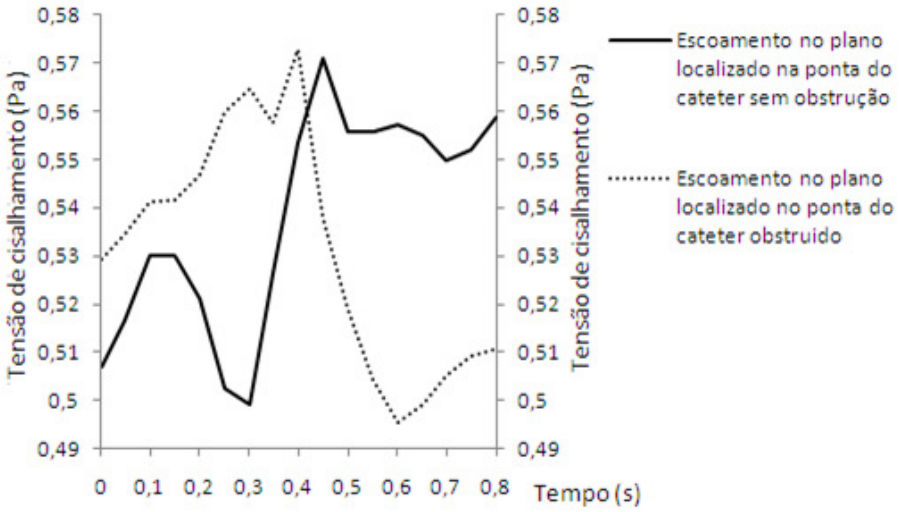


GRÁFICO 4.3: Perfil de tensão de cisalhamento no escoamento do plano inserido na região de ponta do cateter com e sem obstrução.

Interessante comentar que, apesar de não apresentar grandes diferenças nos valores de tensão de cisalhamento, o perfil da tensão no gráfico varia no decorrer do tempo: como por exemplo, em tempos maiores que t=0,4s, a tensão de cisalhamento apresenta uma queda rápida e depois tende a se manter estável, no cateter sem obstrução. Por outro lado, no cateter obstruído, a tensão de cisalhamento sofre uma queda maior antes de retornar a valores mais estáveis a partir do tempo t=0,6s.

No plano invertido localizado no orifício venoso, a média de velocidade para o cateter desobstruído foi de 0,09±0,01m/s e para o cateter obtruído foi de 0,081±0,009m/s. O GRA 4.4 apresenta o perfil de velocidade nesse plano.

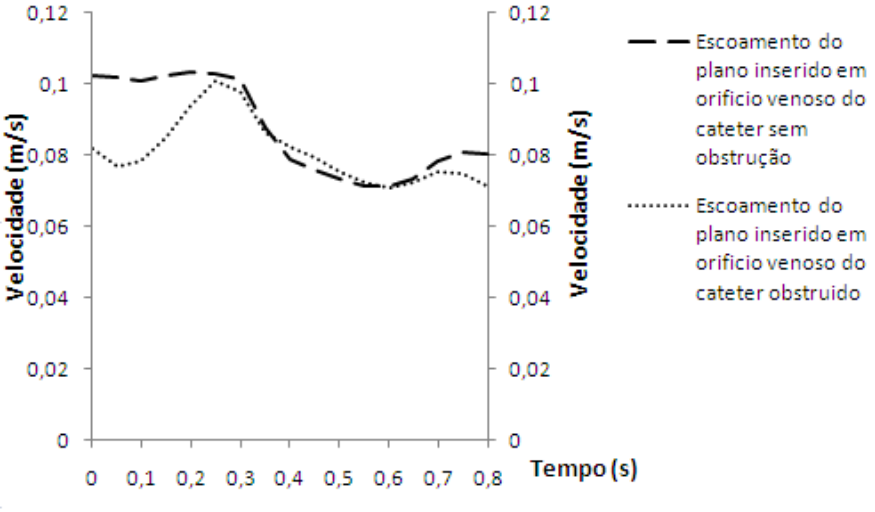


GRÁFICO 4.4: Perfil de velocidade no escoamento do plano inserido na região de obstrução venosa do cateter com e sem obstrução.

A FIG 4.25 apresenta a distribuição dos valores de velocidade no plano inserido na região de obstrução venosa.

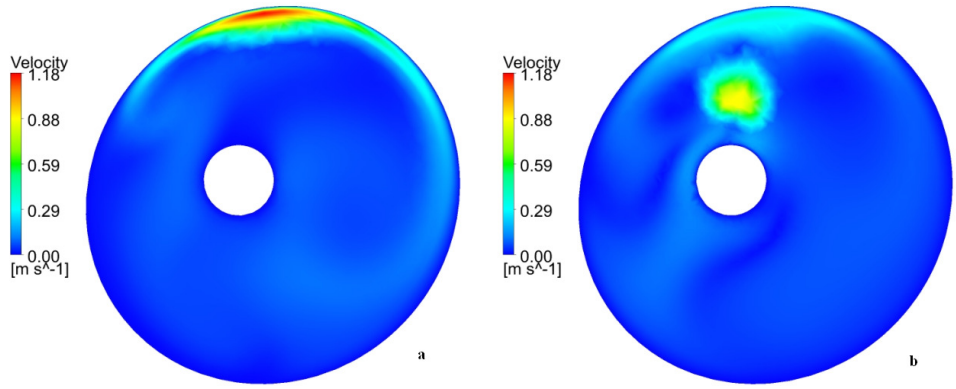


FIGURA 4.25: Distribuição da velocidade no plano inserido em área de obstrução venosa do cateter obstruído (a) e desobstruído (b).

A tensão de cisalhamento máxima para os dois escoamentos foi no tempo t= 0,29 s, com 0,91Pa para o cateter com obstrução e 0,84Pa para o cateter sem obstrução. A média de valores de tensão para o cateter obstruído foi de 0,86±0,03 Pa e para o cateter sem obstrução a tensão de cisalhamento média foi de 0,76 ±0,06 Pa.

No escoamento do plano localizado na região de orifício arterial em que se encontrava a obstrução, a média de velocidade do cateter obstruído foi de 0,021±0,005 m/s e para o cateter desobstruído a velocidade média foi de 0,018±0,009 m/s. Sendo a velocidade do escoamento menor nesta região, a probabilidade de desenvolvimento do trombo aumenta quando comparada as outras regiões em que se inseriu o plano invertido. O GRA 4.5 apresenta o perfil de velocidade na região de obstrução arterial no cateter obstruido e desobstruído.

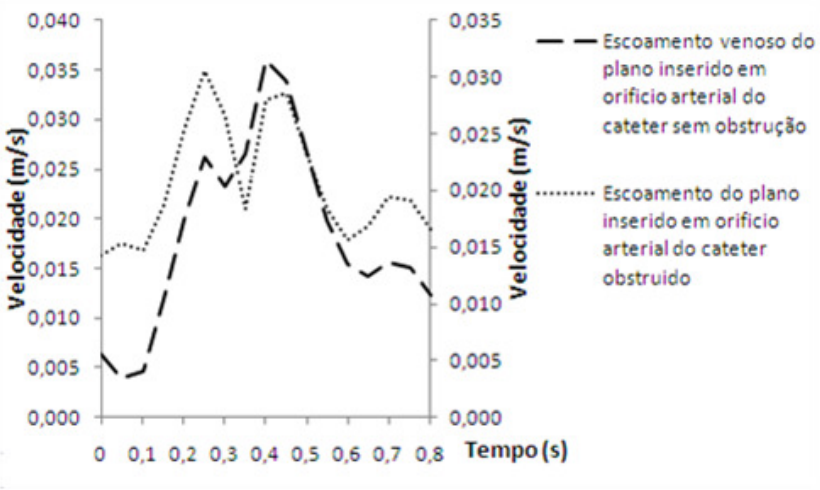


GRÁFICO 4.5: Distribuição da velocidade no plano inserido na região de obstrução arterial no cateter obstruído e desobstruído.

A FIG 4.26 apresenta a distribuição da velocidade no cateter com obstrução (a) e sem obstrução (b) no tempo t=0,4s na região de obstrução arterial.

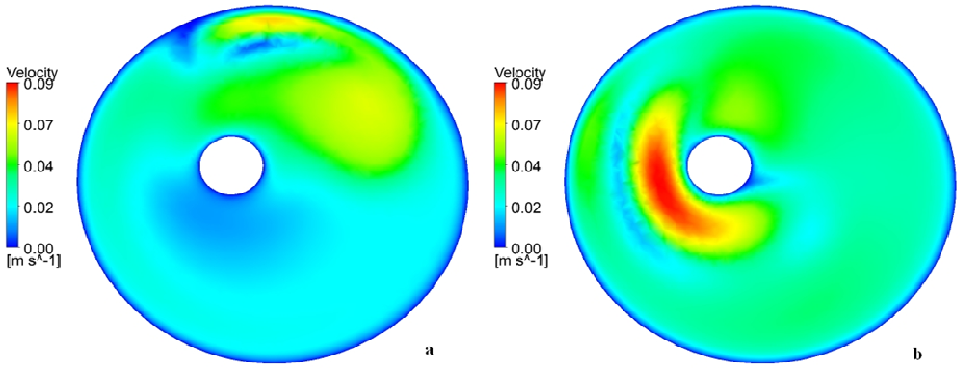


FIGURA 4.26: Distribuição da velocidade no plano inserido na região arterial em que se inseriu uma obstrução (a) e na região correspondente no cateter em que não se inseriu obstrução (b).

Quanto à tensão de cisalhamento no plano inserido na região de obstrução arterial, a média foi de 0,20±0,02 Pa no cateter com obstrução e 0,17±0,05 Pa no cateter em que não foi obstruído parcialmente. Neste plano, as tensões de cisalhamento apresentaram-se menores em ambos os cateteres.

A tensão de cisalhamento apresentou-se maior no plano inserido na região venosa com obstrução. Os orifícios mais distais possuem uma região de menor de escoamento e velocidade, sugerindo um aumento de risco para a formação de trombos. Portanto, uma das desvantagens desses cateteres é o alto nível de recirculação que os orifícios laterais promovem no escoamento sanguíneo e grandes variações na tensão de cisalhamento que, além de reduzir a eficiência da diálise promove ativação plaquetária.

4.3) Estudo numérico do escoamento no interior da veia e no interior do CVC desobstruído nos regimes laminares e turbulentos

Ao comparar os vetores de velocidade, observou-se que o jato central de velocidade do escoamento em regime turbulento foi maior no orifício central do cateter quando comparado ao escoamento em regime laminar. Os vetores de velocidade do escoamento em regime laminar apresentaram maiores no orifício arterial 4 quando comparados ao escoamento em regime turbulento. A FIG 4.27 apresenta os vetores no escoamento em regime laminar e no escoamento em regime turbulento.

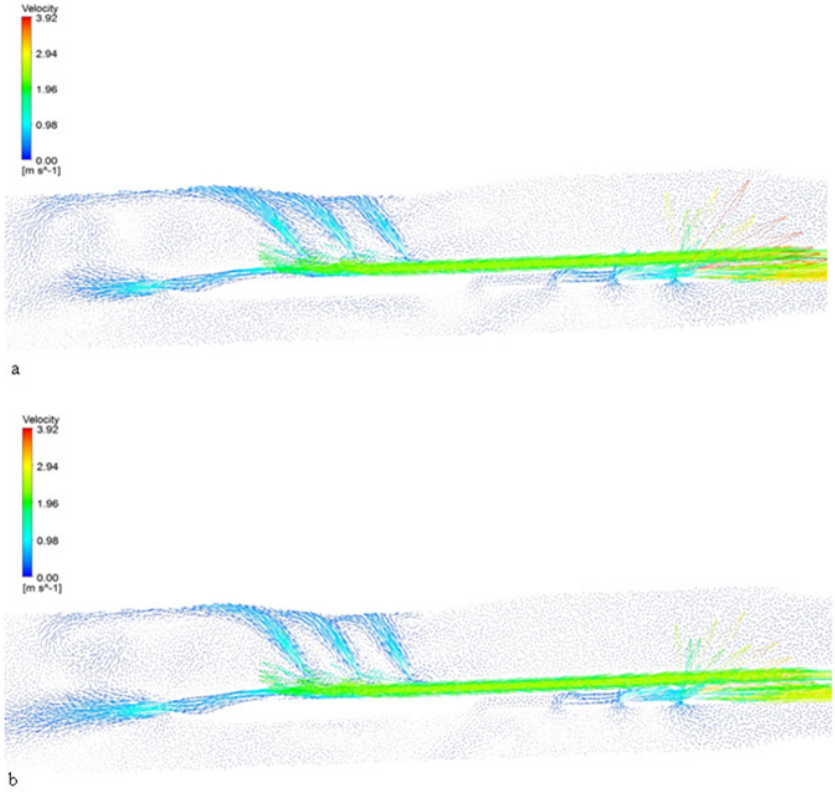


FIGURA 4.27: Distribuição dos vetores de velocidade no cateter inserido no escoamento em regime laminar (a) e no escoamento em regime turbulento (b).

Para entender o perfil do escoamento venoso, fez-se uma ampliação das imagens dos vetores de saída venosos. A FIG 4.28 mostra uma área mais extensa que sai do orifício central do cateter no escoamento em regime turbulento. As setas indicam a presença de vórtices um pouco mais definidos nesse regime. No entanto, quando se verifica as áreas de separação de escoamento e de recirculação não se verificou diferenças consideráveis entre os vetores de velocidade dos escoamentos em regimes laminares e turbulentos.

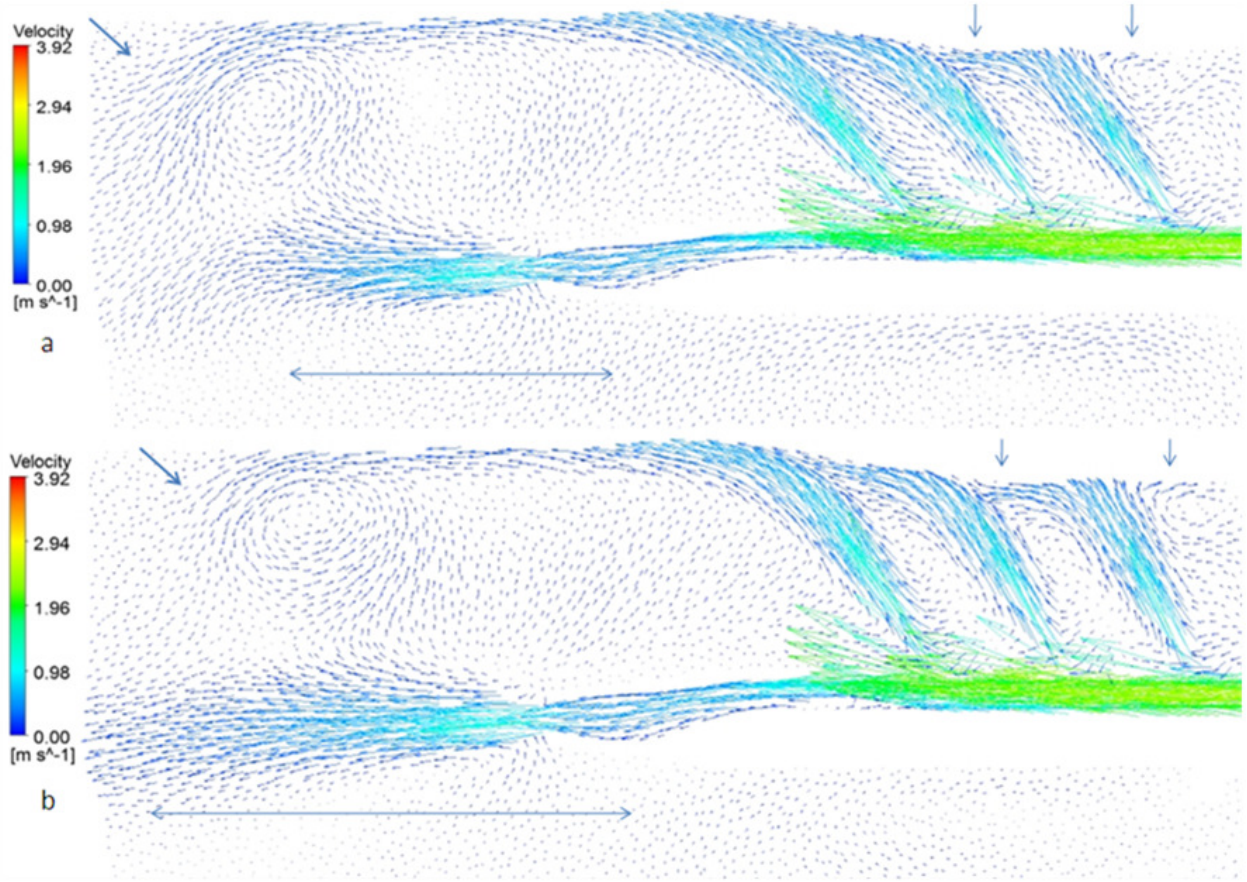


FIGURA 4.28: Distribuição dos vetores nos orifícios de saída do CVC no escoamento em regime laminar (a) e no escoamento em regime turbulento (b).

A FIG 4.29 apresenta a pressão no interior do cateter no escoamento em regime laminar e no escoamento em regime turbulento no tempo t=0,4s. No decorrer do tempo, a pressão apresentou-se maior no regime turbulento. No regime turbulento a pressão média máxima foi de 3198 Pa no tempo t=0,3s e no regime laminar a pressão média máxima foi de 2915Pa. O aumento foi de 9%. A diferença da pressão mínima em ambos os regimes foi de 4% no tempo t= 0,1s sendo 1725 Pa no escoamento em regime laminar e 2004 Pa no escoamento em regime turbulento.

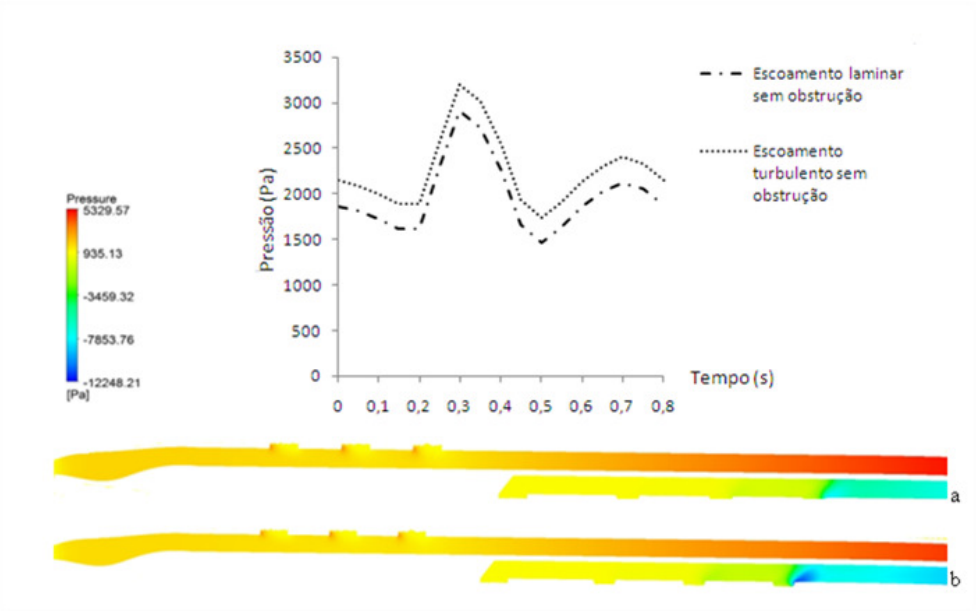


FIGURA 4.29: Distribuição da pressão no escoamentoem regime turbulento (a) e no escoamento em regime laminar (b).

A mediana de valores no escoamento em regime laminar foi de 1866 (IQR: 1662-2124) Pa e no escoamento em regime turbulento foi de 2145(IQR:1938-2401) Pa.

A FIG 4.30 representa o perfil de velocidade no escoamento em regime laminar (a) e no escoamento em regime turbulento (b).

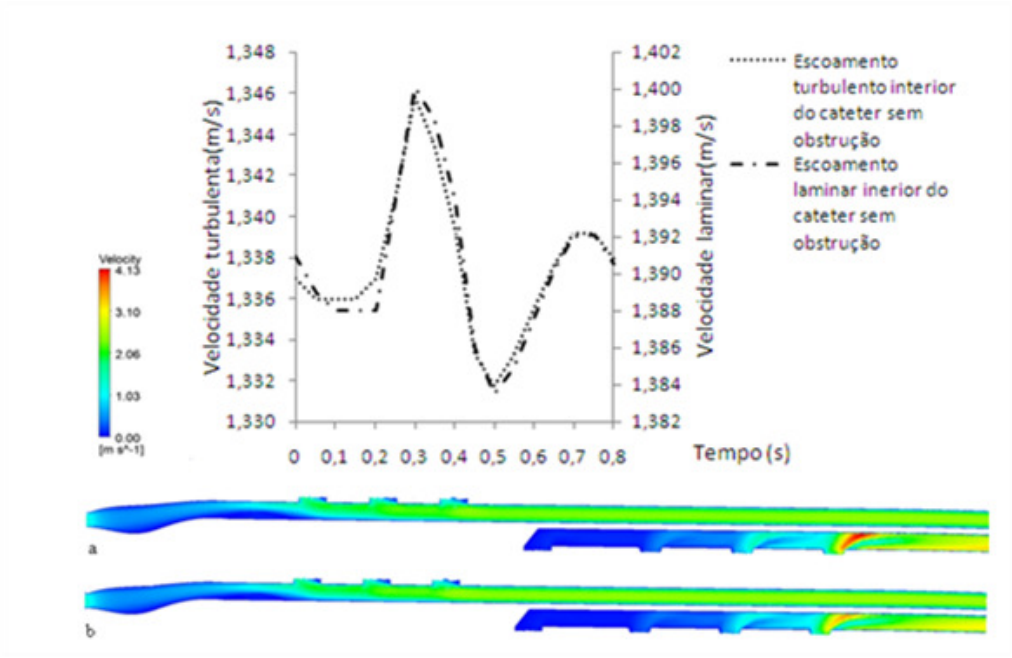


FIGURA 4.30: Perfil de velocidade no escoamento em regime laminar (a) e no escoamento em regime turbulento (b).

A média de velocidade do escoamento em regime laminar foi de 1,392 ± 0,004 m/s e no escoamento em regime turbulento foi de 1,342 ± 0,001m/s.

No que diz respeito à velocidade do escoamento no orifício central do cateter, a FIG 4.33 apresenta os contornos em regime turbulento (FIG 4.31 (a) e em regime laminar (FIG 4.31 (b)).

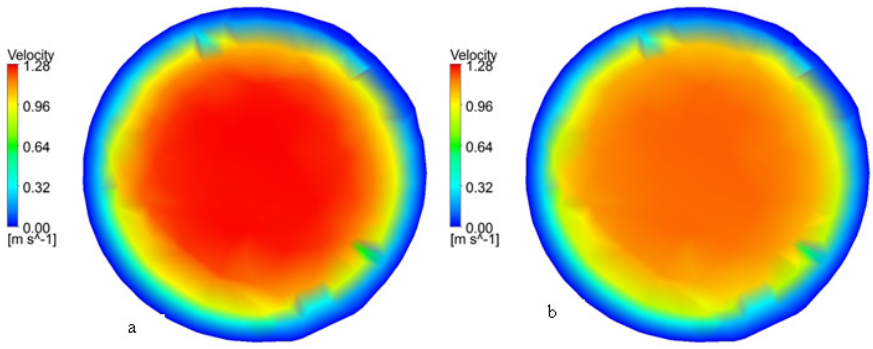


FIGURA 4.31: Distribuição do perfil de velocidade no escoamento em regime turbulento (a) e em regime laminar (b).

De acordo com as imagens pode-se notar que o escoamento que o cateter estava presente apresentou maior velocidade no regime turbulento. A mediana de valores de velocidade do escoamento em regime laminar foi de 0,942 (0,933-0,953) m/s e a do escoamento em regime turbulento foi de 0,998 (0,994 -1,007) m/s. O GRA 4.6 apresenta os valores de velocidade no orifício final do cateter.

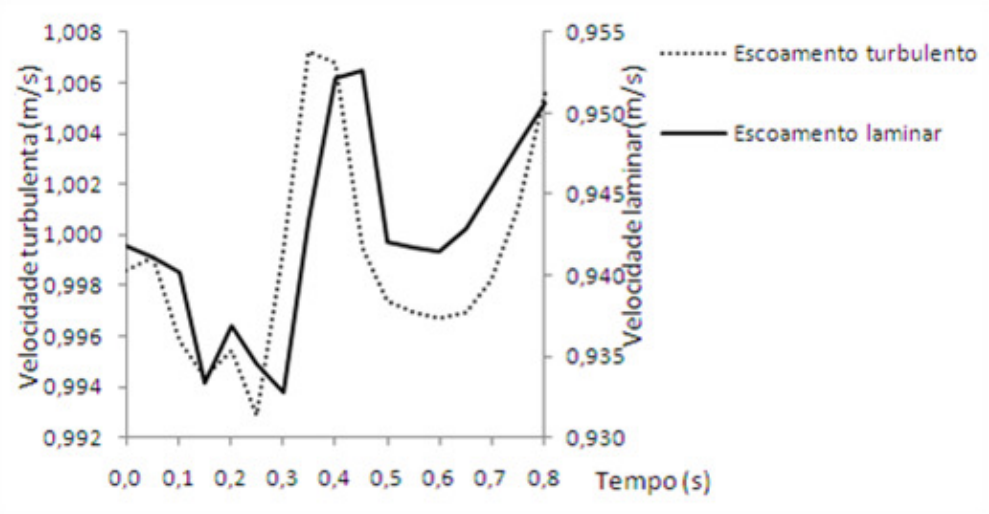


GRÁFICO 4.6: Perfil de velocidade no orifício central da ponta do cateter no escoamento em regime laminar e turbulento.

No que se referem aos valores de pressão, os valores no escoamento em regime turbulento apresentaram-se maiores. A maior diferença entre os regimes foi no tempo de 0,15s com uma pressão de 800 Pa no laminar e 886 Pa no turbulento. A mediana foi de 1136 (IQR: 930-1397) Pa no regime turbulento e de 1056 (IQR: 852-1318)Pa no regime laminar. O GRA 4.7 apresenta a distribuição da pressão nos regimes laminares e nos turbulentos.

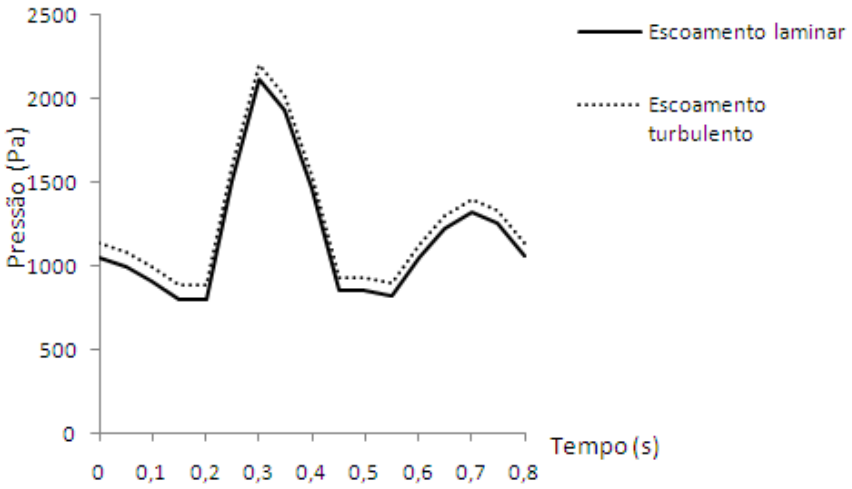


GRÁFICO 4.7: Distribuição da pressão nos regimes laminares e turbulentos no orificio central do CVC.

No que se refere ao orifício venoso 3, os valores de velocidade apresentaram-se maiores no regime laminar. A mediana de valores de velocidade no regime laminar foi de 0,99 (0,99-1) m/s. No escoamento turbulento a mediana foi de 0,86 (0,85-0,86) m/s. O GRA 4.8 apresenta o perfil de velocidade no orificio venoso 3 nos regimes laminares e turbulentos.

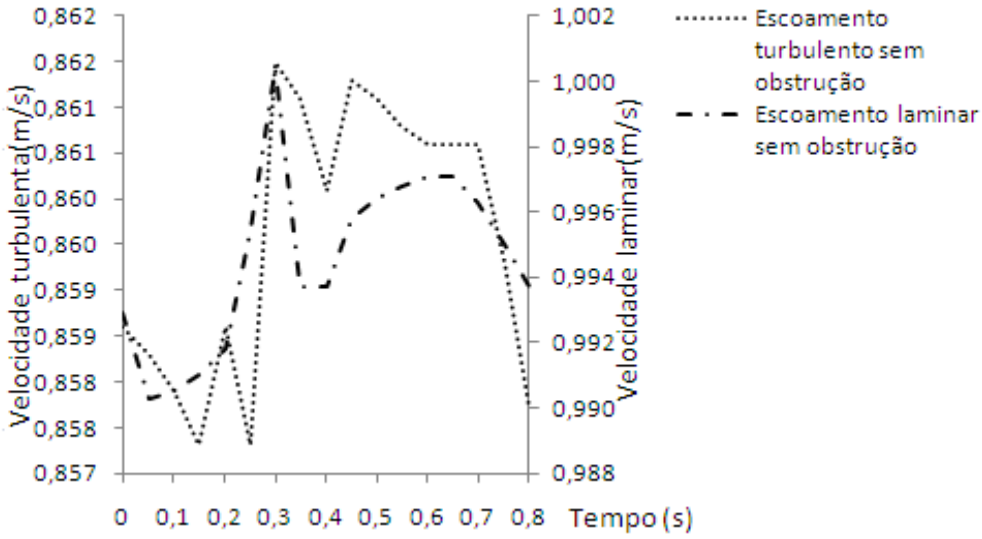


GRÁFICO 4.8: Distribuição de velocidade no orificio venoso nos regimes laminares e turbulentos.

A FIG 4.32 apresenta os contornos de velocidade no escoamento em regime turbulento e laminar no terceiro orificio venoso.

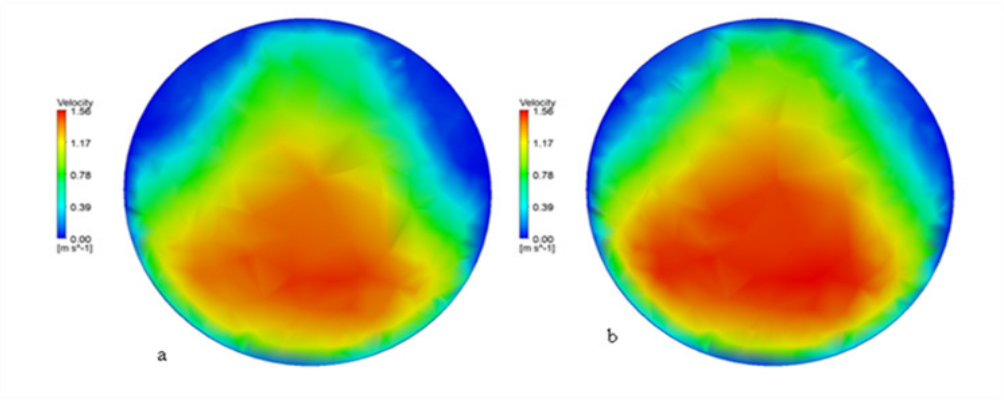


FIGURA 4.32: Distribuição da velocidade no terceiro orifício venoso no regime turbulento (a) e no laminar (b).

Os orifícios arteriais também foram comparados quando nos regimes turbulentos e laminares. O orifício arterial 4 apresentou uma pequena diminuição de velocidade no regime turbulento quando comparado ao laminar. Mediana de 1,83 (1,82-1,86)m/s no regime laminar e de 1,57 (1,56-1,61)m/s no regime turbulento. O GRA 4.9 apresenta o perfil de velocidade laminar e turbulento no orificio arterial 4.

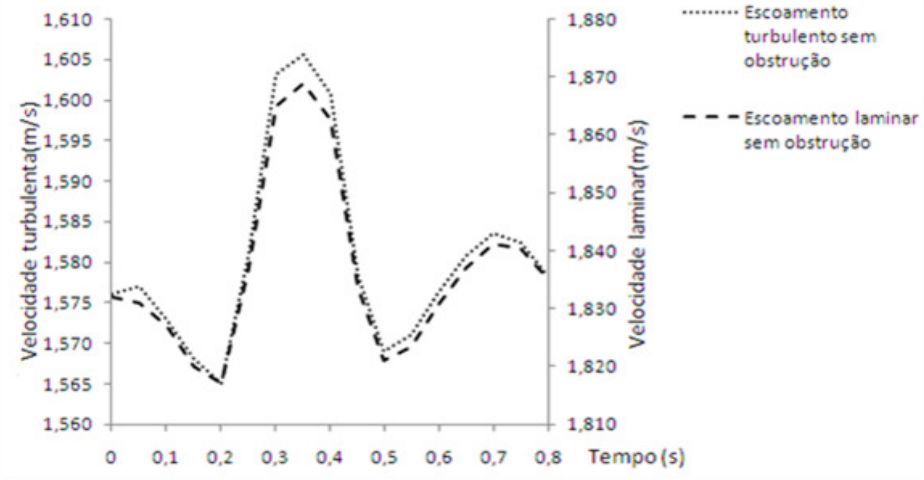


GRÁFICO 4.9: Perfil de velocidade no orifício arterial 4 nos regimes laminares e turbulentos.

No que se refere ao orifício arterial 3, os valores de velocidade foram representados no GRA 4.10. A mediana de velocidade no regime laminar foi de 0,69 (0,68 -0,71)m/s e no turbulento foi de 0,53 (0,53-0,55) m/s.

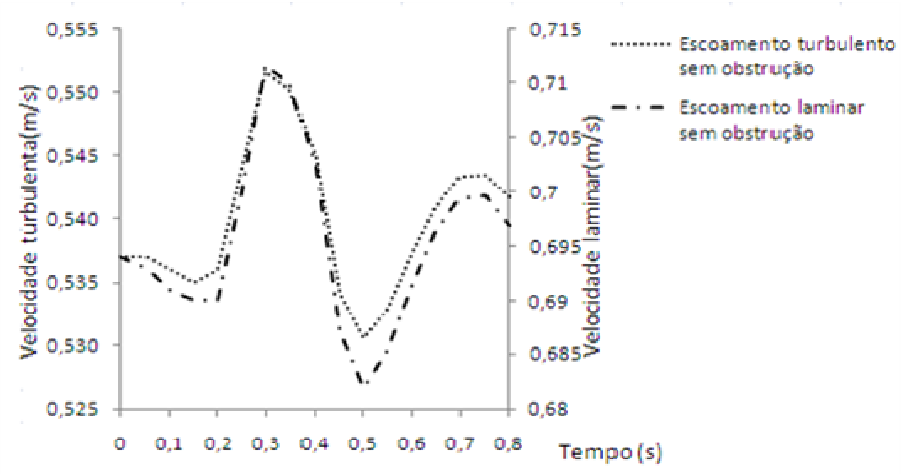


GRÁFICO 4.10: Perfil de velocidade no orifício arterial 3 nos regimes laminares e nos turbulentos.

No primeiro orifício arterial, a mediana da velocidade no escoamento em regime turbulento foi de 0,05m/s (mínimo de 0,041m/s e máximo de 0,059 m/s). A mediana no escoamento em regime

laminar foi de 0,073m/s (mínimo de 0,069m/s e máximo de 0,090 m/s). O GRA 4.11 apresenta o perfil de velocidade nos regimes laminares e turbulentos no orificio arterial 1.

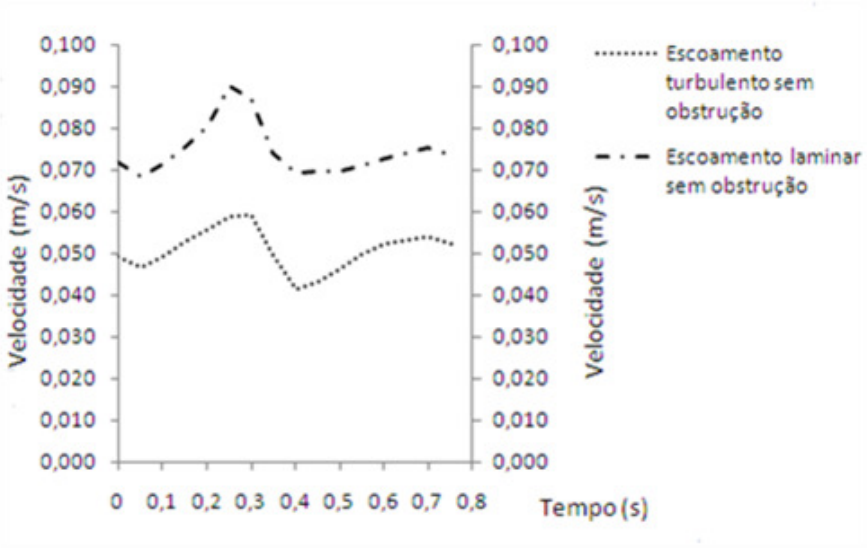


GRÁFICO 4.11: Perfil de velocidade no orifício arterial 1 nos regimes laminares e nos turbulentos.

Avaliou-se ainda, os valores de pressão nos três planos inseridos no interior do cateter venoso na região anterior, mediana e posterior à obstrução dos dois primeiros orifícios venosos. A FIG 4.33 apresenta os valores de pressão nos escoamentos laminares e turbulentos.

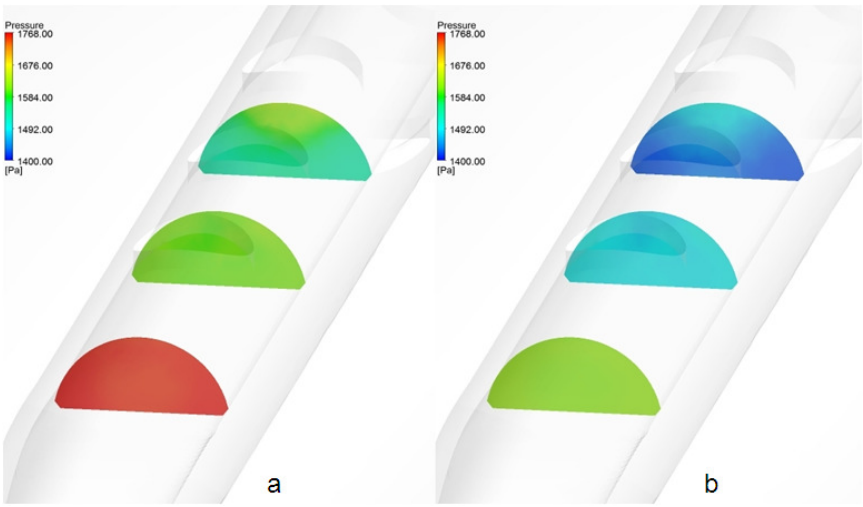


FIGURA 4.33: Distribuição da pressão nos escoamentos turbulentos (a) e laminares (b).

A TAB 4.5 apresenta os valores de pressão nos regimes laminares e turbulentos.

TABELA 4.5

Distribuição dos valores de pressão nos regimes laminares e turbulentos.

Planos	Regime Laminar	Regime turbulento
	Pressão (Pa) Mediana (IQR)	Pressão (Pa) Mediana (IQR)
Região Anterior	1331 (1128-1595)	1470 (1265-1729)
Região Mediana	1772 (1567-2035)	1900(1692-2159)
Região Posterior	2262 (2057-2524)	2398(2190- 2658)

De acordo com a TAB 4.5 observou-se um aumento da pressão no interior do cateter quando o regime é turbulento. A pressão no plano inserido na região posterior apresentou-se maior no escoamento em regime turbulento, o que indica uma maior pressão de saída do orificio central, na parede da veia quando comparado ao regime laminar.

No que diz respeito aos planos invertidos inseridos no cateter, o plano inserido na região de orifícios arteriais, a velocidade apresentou-se menor no regime turbulento. O GRA 4.12 apresenta o perfil de velocidade no plano inserido na região arterial, nos regimes laminares e turbulentos.

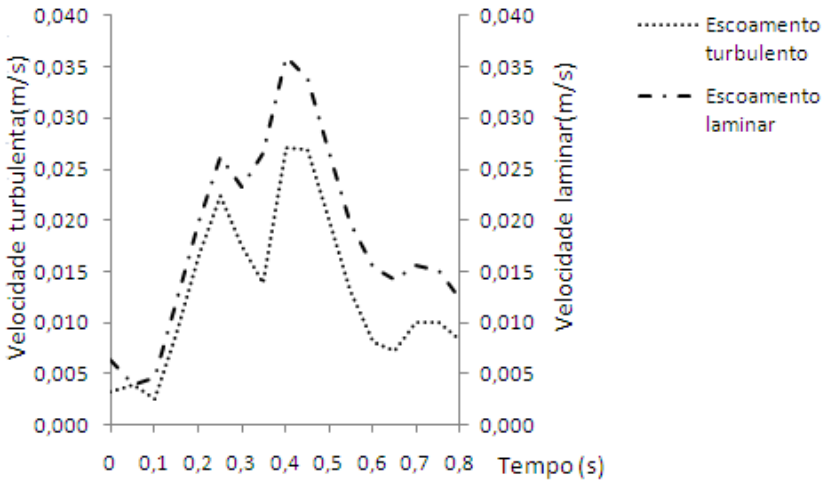


GRÁFICO 4.12: Distribuição da velocidade no plano invertido inserido na região arterial nos regimes laminares e turbulentos.

A média de tensão de cisalhamento turbulenta foi de 0,13±0,04 Pa enquanto que a tensão de cisalhamento laminar foi de 0,17 ±0,05 Pa. O GRA 4.13 apresenta a tensão de cisalhamento nos regimes laminares e turbulentos.

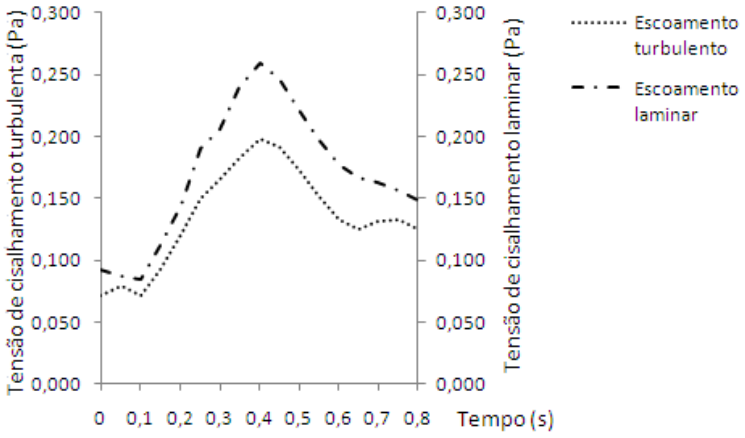


GRÁFICO 4.13: Perfil de tensão de cisalhamento nos regimes laminares e turbulentos no plano inserido na região arterial.

Quanto ao plano inserido na região de orifícios venosos, o perfil de velocidade esta representado no GRAF 4.14. A média de velocidade para ambos os escoamentos foi de 0,088m/s ±0,001.

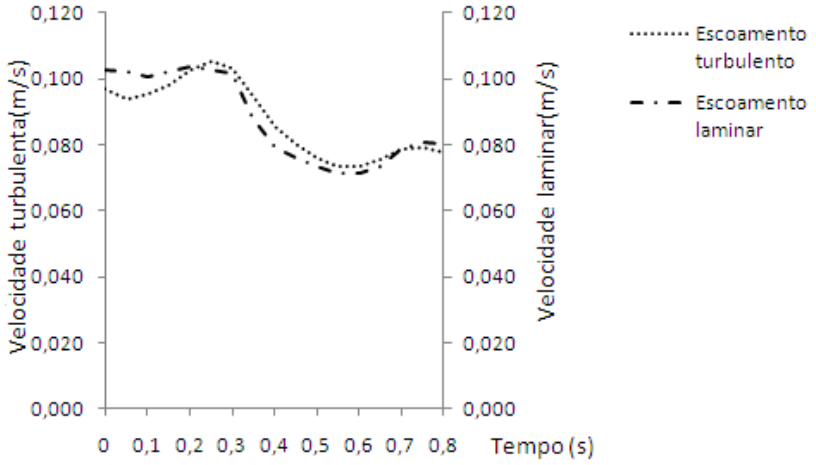


GRÁFICO 4.14: Perfil de velocidade nos escoamentos em regimes laminares e turbulentos no plano inserido na região de orifício venoso.

A tensão de cisalhamento turbulenta apresentou uma média de 0,73 ±0,05Pa e a tensão de cisalhamento laminar foi de 0,76±0,06Pa.

4.4) Estudo numérico do escoamento no interior da veia e no interior do CVC desobstruído e obstruido nos regimes laminares e turbulentos de fluidos não-Newtonianos.

Numero de Reynolds e valores de k e ω

É importante destacar o valor do número de Reynolds. No que se refere à região do segmento venoso do cateter sem obstrução, o numero de Reynolds foi de 835 (considerando a vazão de 0,005 kg s^{-1} (DP±0,0001) para todos os dois regimes, laminares e turbulentos com e sem obstrução) no decorrer do tempo. A região de obstrução venosa apresentou um Reynolds de 844.

No que se refere à região arterial do cateter, a vazão média em todos os regimes laminares e trubulentos com e sem obstrução foi de 0,008 kg s^{-1} (DP±0,002) e o número de Reynolds foi de 1375. Na região de obstrução arterial o Reynolds foi de 1384. No que se refere à região venosa, fez-se uma análise do número de Reynolds na região final da base da veia cava. Como ocorre uma variação da vazão mássica durante o ciclo cardíaco, observou-se que no escoamento em regime laminar com o

cateter desobstruído o número de Reynolds variou de 0,46-186. No escoamento em regime laminar com o cateter obstruído, o número de Reynolds variou de 1,20-188. No escoamento em regime turbulento que continha o cateter sem obstrução, o número de Reynolds variou de 21 a 206 enquanto que no escoamento em que continha o cateter obstruído o número de Reynolds variou de 21-209. Sendo assim, o escoamento na veia também apresentou um regime laminar.

Entretanto, justifica-se o regime turbulento neste estudo, para melhor entender as regiões de formação de vórtice e de recirculação nas regiões próximas aos orifícios do cateter venoso central. Além disso, as flutuações de velocidade e pressão poderiam levar a uma transição do regime laminar para o turbulento que ainda requerem profunda investigação na literatura (ABRAHAM *et al.*, 2011).

Fez-se ainda uma análise dos valores de k e ω para entender as flutuações de velocidade no devorrer das entradas e saídas do escoamento no interior da geometria venosa e no interior do cateter. Encontrou-se uma diferença de 50% entre os valores de k e ω no decorrer do ciclo cardiaco no interior do escoamento venoso. No interior do cateter a diferença entre os valores de k and ω variou de 34% a 67%. Dessa forma, essas diferenças indicaram que o regime turbulento pode ser importante para definir as flutuações de velocidade e de recirculação no interior dos vórtices.

Vetores velocidade e linhas de corrente

A FIG 4.34 apresenta as linhas de corrente no interior da veia e os vetores de velocidade ampliados na região próxima aos orifícios, no interior do escoamento em regime laminar quando inserido um CVC obstruído e não obstruído (t=0,4s).

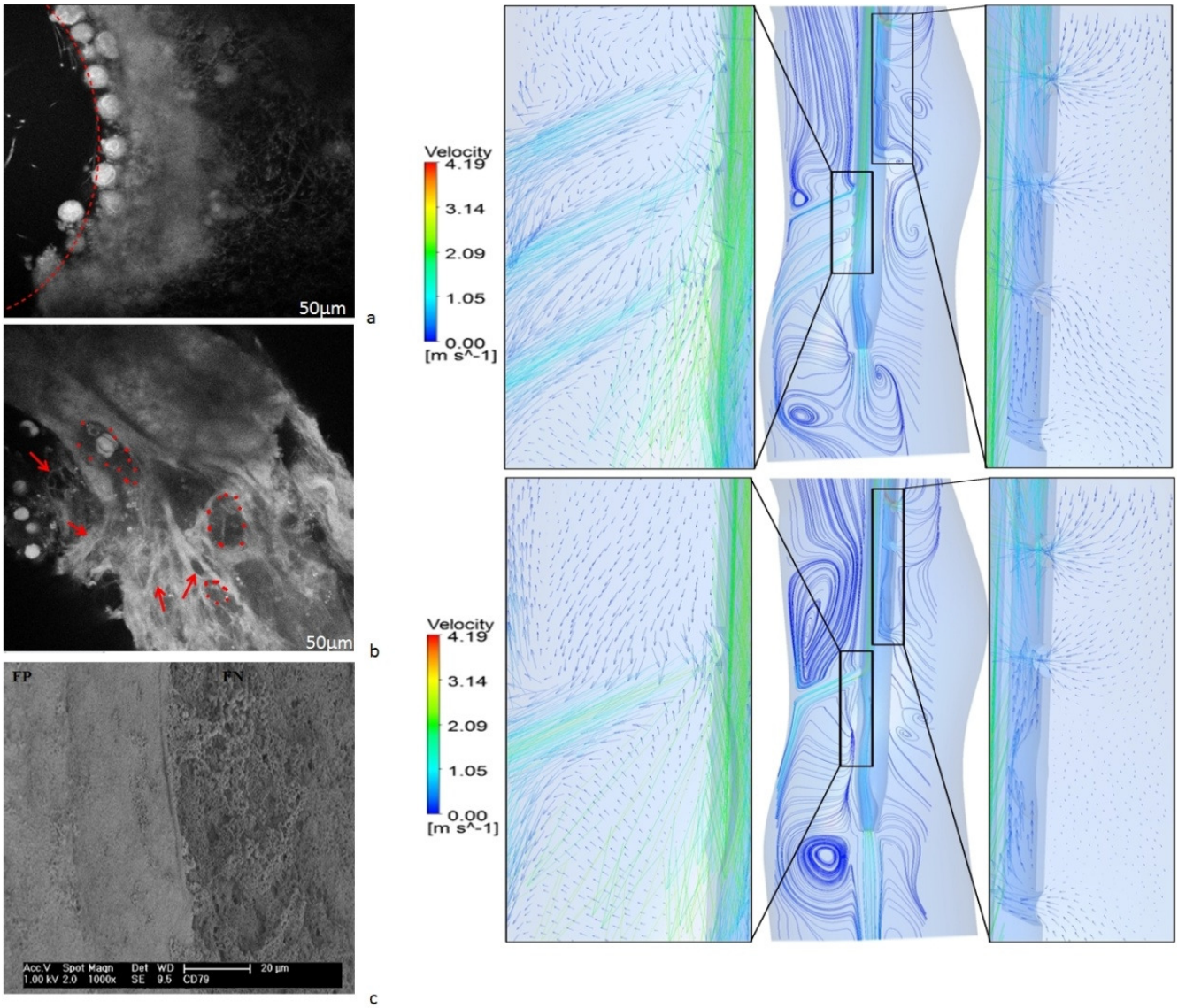


FIGURA 4.34: Perfil das linhas de corrente no interior da veia e do CVC. Da imagem superior à inferior: cateter desobstruído e cateter com parcial obstrução no escoamento laminar. As imagens ampliadas apresentam os vetores próximos aos orifícios venosos e arteriais. Imagens da microscopia de varredura a laser de dois fótons: placa e rede de fibrina circundada por glóbulos brancos (a). As marcações em circulo de vermelho indicam contorno parede interna do orificio venoso. A seta dupla delimita a prede do orificio (a). A imgem (b) representa a fibrina hidratada ao redor da parede interna do orifício venoso. As setas em vermelho indicam a mudança de direção das fibras. MEV em (c) apresenta a placa de fibrina próxima a região de borda do cateter e rede de fibrina em direção ao centro. Magnificação original 1000x.

A FIG 4.34 (c) apresenta em MEV a placa de fibrina na região da borda da parede do cateter e a rede de fibrina em direção ao centro.

O padrão do escoamento é não uniforme e irregular tanto no cateter obstruído quanto no cateter desobstruído, incluindo áreas de recirculação, vórtices com linhas de recirculação reversa e mudanças na direção do escoamento no decorrer do tempo. Áreas de recirculação e de estagnação do escoamento podem ser claramente visualizadas na saída dos orifícios venosos. A existência de uma perturbação no escoamento fornece uma possível explicação para a origem da fibrina na parede interna do orifício do cateter como mostra na FIG 4.34(a). A imagem feita com a microscopia de varredura a laser de dois fótons apresenta a placa de fibrina circundada por glóbulos brancos na parede interna do orifício venoso. A rede de fibrina pode ser vista seguindo a placa de fibrina, em direção ao centro do trombo.

Sendo assim, quanto mais se afasta da parede do orificio, mas as fibras tendem a formar um aspecto de malha. A disposição das fibras que contém a placa de fibrina em estado hidratado pode ser vista na FIG 4.34 (b). As setas vermelhas da figura indicam a mudança de direção das fibras não alinhadas em paralelo, mas que seguem a direção do escoamento. Neste caso, a direção do escoamento pode estar associada à presença de vórtices devido à apresentação contorcida das fibras. Além disso, a delimitação em vermelho na FIG 4.34 (b) representa regiões de vazios em que as fibras se bifurcam e mudam de direção. Podem-se notar neste caso, que são regiões localizadas, possivelmente regiões de vórtice em que as fibras mudam de disposição e alinhamento na região de placa de fibrina.

Interessante notar que, o jato de fluxo que sai do orificio central no cateter obstruído apresentou uma maior pressão e velocidade quando comparado ao cateter desobstruído em ambos os regimes laminares e turbulentos. No entanto, a pressão de saída no escoamento em regime turbulento apresentou maior velocidade e pressão quando comparado ao escoamento em regime laminar. No cateter obstruído após o jato central de alta velocidade, o escoamento se dividiu em regiões de baixa velocidade próximo à parede do vaso, devido à formação de vórtices. Comparando-se o perfil dos vetores no escoamento em regime laminar e turbulento, não se observou grandes diferenças significativas entre os vetores. Embora os vórtices apresentaram-se mais definidos no regime turbulento. As linhas de corrente e os vetores de velocidade mostraram maiores áreas de recirculação e de separação de escoamento (local em que as camadas limites se separaram a partir da superfície do cateter e geram áreas de recirculação, onde o gradiente de velocidade e tensão de cisalhamento pode

chegar a zero) no cateter obstruído quando comprado ao não obstruído. A FIG 4.35 apresenta as linhas de corrente e os vetores no escoamento em regime turbulento (t=0,4s).

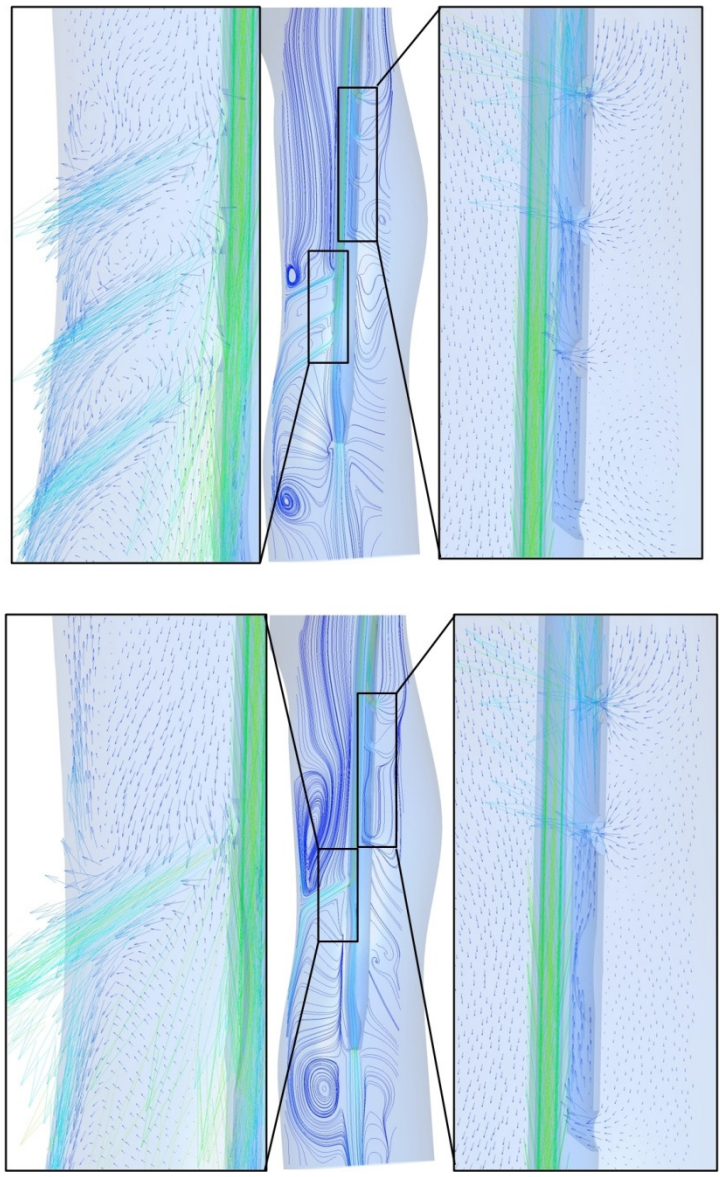


FIGURA 4.35: Perfil das linhas de corrente no interior da veia e do CVC no escoamento em regime turbulento. Da imagem superior à inferior: cateter desobstruído e cateter com parcial obstrução. As imagens ampliadas apresentam os vetores próximos aos orifícios venosos e arteriais.

Um estudo computacional fluido dinâmico comparou o escomento de cânulas venosas na presença e na ausência de orifícios laterais (PARK, 2012). O estudo encontrou que as cânulas que apresentavam orifícios laterais causavam um distúrbio no escoamento e que, a minimização de tal distúrbio somente seria alcançada com novos modelos de cânulas venosas (PARK, 2012). Ressalta-se que, as cânulas somente aspiram ao fluido e não funciona como o cateter de duplo lúmen de hemodiálise. Entretanto, em acordo com esse estudo, a presença dos orifícios laterais causa um distúrbio no escoamento suficiente para estimular a produção contínua de fibrina.

Outro estudo avaliou a estrutura de um trombo venoso in *vivo* por meio de imagem de ressonância magnética, e verificou por meio de um modelo computacional fluido dinâmico de uma veia estenosada, que os vórtices formados contribuiam para a agregação plaquetaria, deposição e conformação de plaquetas-fibrina no interior do trombo venoso (BADJ *et al.*, 2012). Embora a abordagem desse estudo seja diferente, os vórtices formados na região venosa no presente estudo, devido à presença do cateter também podem estar associados à assimetria das diversas camadas de fibrina depositadas no interior do orifício venoso, uma vez que, a concentração de plaquetas nesta região pode ser alta devido ao transporte de massa realizado pelos vórtices.

Além disso, o estudo de BADJ *et al.* (2012) concluiu que as camadas de plaquetas observadas nas imagens apresentaram a forma contorcida devido à presença de vórtices. Também no presente estudo, as imagens de fibrina muitas vezes apresentaram-se como emaranhados de fibras contorcidas e assimétricas como mostram as FIGs 4.34 b e 4.36 que pode ser justificado pela presença de vórtices.

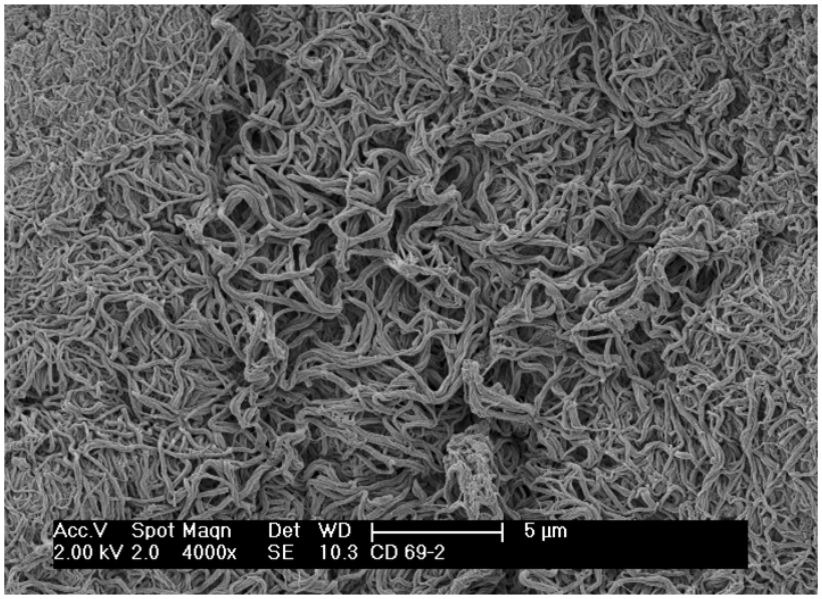


FIGURA 4.36: Fibras de fibrina contorcidas e assimétricas formando emaranhados heterogêneos. Microscopia eletrônica de varredura. Magnificação original 4000x.

Vale à pena comentar que, no interior do escoamento e ao redor dos orfícios venosos foram vistos regiões de formação de vórtices, de separação de escoamento e recirculação tanto no cateter obstruído quanto no desobstruído. Estudos têm mostrado que a agregação de plaquetas ocorre preferencialmente nas regiões de baixa tensão de cisalhamento como em regiões de recirculação e separação de escoamento (SHERIFF, 2010; RUBENSTEIN; YIN, 2010; CHIU; CHIEN, 2011; YIN *et al.*, 2011; KIM *et al.*, 2012).

Tem sido reportado que em áreas de recirculação de escoamento a tensão de cisalhamento se mantém com valores muito baixos (0,0 - 1,0 Pa) em condições de escoamento reverso durante todo o tempo do ciclo cardíaco (YIN *et al.*, 2011; KIM *et al.*, 2012). A baixa tensão de cisalhamento pode induzir a um aumento significantivo dos fatores de expressão para agregação plaquetaria que ativam a cascata de coagulação nas células endoteliais (NESBITT *et al.*, 2009; HAYNES *et al.*, 2011; KIM *et al.*, 2012).

Além disso, nas áreas de estagnação de escoamento e de recirculação, as plaquetas podem ficar estacionárias e expostas à baixa tensão de cisalhamento por um longo período de tempo.

Eventualmente, tornam-se ativadas e dão inicio à formação de fibrinas (NESBITT *et al.*, 2009, HAYNES *et al.*, 2011; KIM *et al.*, 2012). Os vetores mostraram que na região de entrada dos orifícios arteriais não apresentava recirculação, e nem mesmo a presença de vórtices como visto nas regiões de saída dos orifícios venosos.

Entretanto, observaram-se na FIG 4.34 pontos de estagnação e de separação de escoamento próximo à parede do cateter que está localizada entre os orifícios laterais arteriais, que também são regiões potenciais a darem inicio à ativação e agregação de plaquetas. Esses achados poderiam sugerir que os orifícios venosos apresentam regiões de perturbação de escoamento maior que nas regiões arteriais e consequentemente apresentam um potencial elevado para o desenvolvimento do trombo e modulação da fibrina.

Além disso, as regiões da parede do cateter localizada entre os orifícios venosos são separadas pelas regiões dos orifícios venosos em que saem fluxo com alta velocidade e com formação de vórtices. Esta região em contato com a parede cria pontos de separação de escoamento até mesmo na saída do orifício venoso como mostrado na FIG 4.34. Isso seria uma plausível explicação para a disposição da placa de fibrina ao redor da parede interna do orifício venoso. Tal disposição pode ser especialmente associada com as regiões de recirculação e separação de escoamento nas proximidades da parede interna do orifício (FIG. 4.34 (a)).

Tipicamente, a fibrina se liga à parede do cateter e se propaga ao longo da direção do escoamento formando uma agregação lateral na borda do cateter, construindo uma placa de fibrina ao longo do tempo de exposição do cateter no escoamento sanguíneo. Interessante destacar que, as regiões extensas de recirculação no orifício venoso geram varias regiões de estagnação que possibilitam uma maior adsorção de fibrinas nas superfícies internas dos orifícios venosos.

A microscopia de varredura a laser de dois fótons é relativamente uma técnica recente que tem mostrado alta potencialidade em imagens em tempo real do processo de trombogênese em ratos submetidos a uma lesão a laser na camada intima da artéria (KAMOCKA *et al.*, 2010). Nesse estudo, observou-se por meio de um vídeo de imagens em tempo real, que o desenvolvimento do trombo perturba o escoamento sanguíneo próximo à superfície externa do trombo. Glóbulos vermelhos e plaquetas foram vistos movendo lentamente nas regiões de formação de vórtices e sendo capturados e incorporados ao tecido trombótico (KAMOCKA *et al.*, 2010). Embora no presente estudo, não se

seguiu o tempo real de formação do trombo em pacientes, as imagens provenientes da microscopia de varredura a laser dois fótons, mostraram que a placa de fibrina que circunda o trombo desenvolve na região que corresponde à de recirculação e formação de vórtices como vistos nos vetores das FIGs 4.34 e 4.35. Os glóbulos brancos que circundavam a superfície da placa de fibrina podem ser associados à biocompatibilidade do material, principalmente em regiões de estagnação do escoamento (VON BRÜHL, 2012; CHEN *et al.*, 2008; RAMBAUT;THIAGARAJAN, 2010; YUAN *et al.*, 2012).

Nessas regiões, o processo inflamatório que o cateter desencadeia na corrente sanguínea, é mais acelerado, uma vez que monócitos e neutrófilos ficam retidos nas regiões de baixa velocidade de fluxo, ao passarem ao longo do cateter aderem à parede polimérica desencadeando um estímulo inicial para o desenvolvimento do trombo (VON BRÜHL, 2012; CHEN *et al.*, 2008, RAMBAUT; THIAGARAJAN, 2010; YUAN *et al.*, 2012).

É conhecido que, a redução da tensão de cisalhamento e velocidade do escoamento é crucial para o recrutamento de glóbulos brancos especialmente neutrófilos e monócitos na presença de um material polimérico na corrente sanguínea (CHEN *et al.*, 2008; WU *et al.*, 2008; RAMBAUT; THIAGARAJAN, 2010). Na presença de um biomaterial, as células imunitárias iniciam o processo de formação de fibrina predominantemente por meio do transporte do fator tecidual (proteína da membrana subendotelial) o qual é o maior iniciador da via extrínseca de coagulação (XU *et al.*, 2009; YUAN *et al.*, 2012). Monócitos e neutrófilos ativados aderem à superfície polimérica, sintetizam e expressam o fator tecidual o qual pode iniciar a coagulação sanguínea e mediar eventos de sinalização intracelular (VON BRÜHL, 2012; CHEN *et al.*, 2008; RAMBAUT; THIAGARAJAN, 2010; YUAN *et al.*, 2012). Recorda-se ainda que, o material desencandeará o processo de coagulação da via intrínseca quando em contato com o sangue e que, após a adsorção de proteínas, a via extrínseca torna-se ativada, uma vez que, o contato com o material representa um estímulo potencial para induzir o fator tecidual expresso pelos monócitos resultando em coagulação do sangue pela via extrínseca.

Vale à pena comentar que, o primeiro evento que ocorre quando um material é inserido na corrente sanguínea é a adsorção de proteínas plasmáticas como o fibrinogênio e o vWf que são proteínas que ativam o processo de coagulação. Seus respectivos receptores contidos nas membranas das plaquetas (integrina ((αIIbβ3)-fibrinogênio e glicoproteina (GPIbα)-vWf) entram em contato com as proteínas adsorvidas tornam-se ativadas e inicia-se a formação de trombos (WU *et al.*, 2008;

COSEMANS *et al.*, 2011). As plaquetas promovem ainda a acumulação de leucócitos, dão suporte para a formação de fibrina pelo aumento de neutrófilos dependentes da coagulação (CHEN *et al.*, 2008, VON BRÜHL, 2012). As proteínas adsorvidas, possivelmente via interações hidrofóbicas tendem a alterar de conformação e expor sítios de ligação protéicos que servem como receptores das células inflamatórias, de plaquetas e de fatores da coagulação. Sendo assim, os materiais poliméricos quando inseridos na corrente sanguínea são cobertos por proteínas adorbidas anteriormente à acumulação de células inflamatórias.

Além disso, tanto a presença do biomaterial quanto de distúrbio no escoamento (recirculação, vórtice e separação de escoamento) contribuem para a modulação da conformação da fibrina no interior dos orifícios venosos. Todo esse processo confirma a complexidade do processo de formação de fibrina na parede interna do cateter, e a inicial ligação da placa de fibrina ao redor do orificio. Com o desenvovimento da placa, leucócitos se aderem à fibrina e estimulam a cascata de coagulação.

b) Tensão de cisalhamento e taxa de deformação

As FIGs 4.37 (a) e (b) apresentam a tensão de cisalhamento na parede interna do orifício venoso no cateter desobstruído e obstruído respectivamente no tempo t=0,4s. As FIGs 4.37 (c) e (d) mostram a tensão de cisalhamento na parede no escoamento em regime turbulento do cateter desobstruído e obstruído respectivamente. As micrografias mostram a parede interna do orifício venoso de um cateter após 5 dias de permanência na veia do paciente. As micrografias ampliadas das FIGs 4.37 (h) e (i) mostram as camadas longitudinais de fibrina em direção circunferencial ligadas à parede interna do orifício venoso. Também pode ser visto imagens fotográficas dos cateteres desobstruídos e obstruídos. As setas mostram o terceiro orifício venoso o qual foi analisado neste estudo. As FIGs 4.37 (e) e (f) ilustram os contornos da taxa de deformação na superfície externa do terceiro orifício venoso de um cateter não obstruído e obstruído respectivamente.

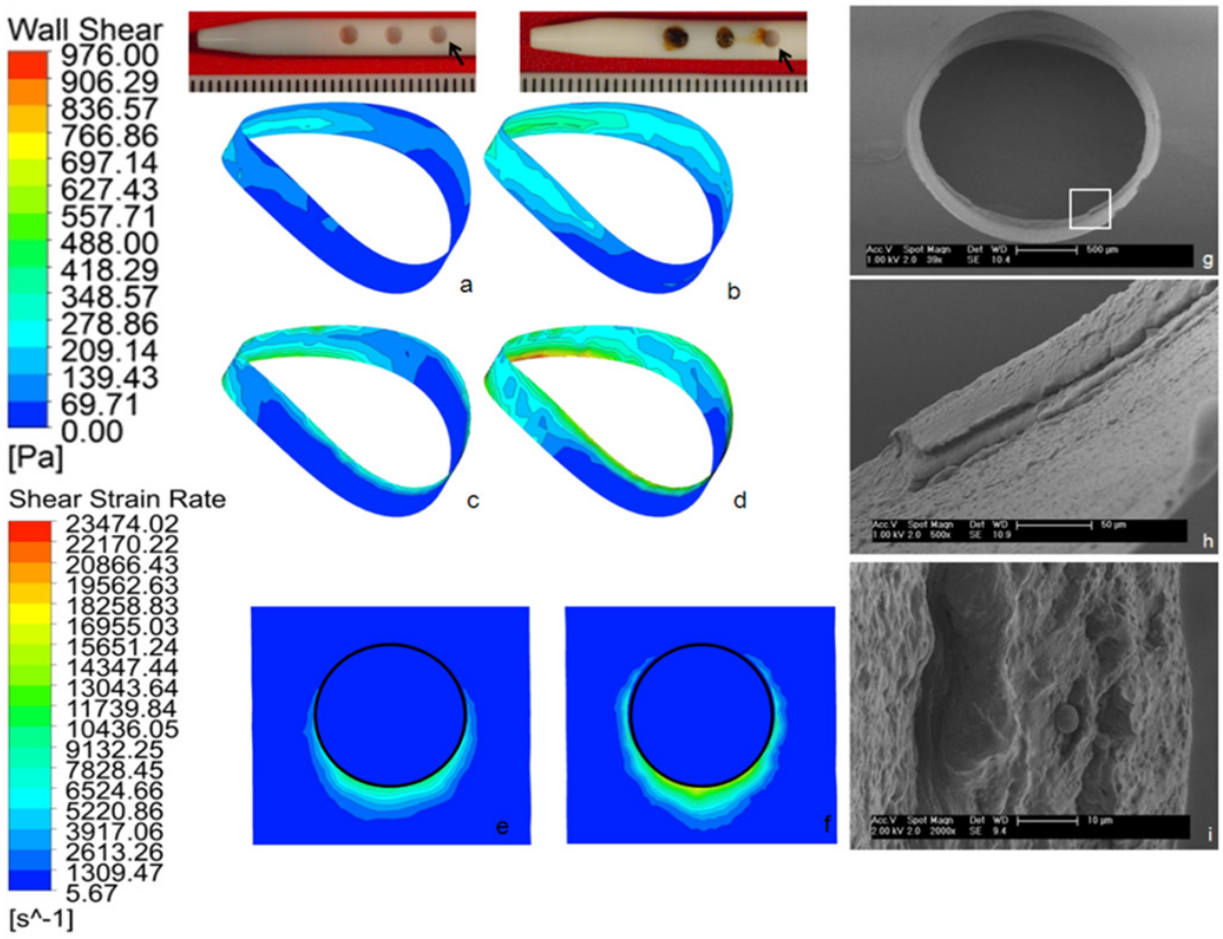


FIGURA 4.37: Distribuição da tensão de cisalhamento na parede do terceiro orificio venoso do cateter nos regimes laminares e turbulentos. As imagens (a) e (b) representam o escoamento em regime laminar de um cateter desobstruido e obstruido respectivamente.As imagens (c) e (d) representam o escoamento em regime turbulento de um cateter desobstruido e obstruido respectivamente. As imagens e e f representam a tensão de deformação na superficie externa do terceiro orificio venoso não obstruido (e) e obstruido (f). Micrografias da parede interna do cateter (g), imagens ampliadas h e i das camadas de fibrinas ligadas à parede interna do orificio venoso. Microscopia eletronica de varredura. Magnificação original 100x, 500x e 1000x.

A FIG 4.38 apresenta a tensão de cisalhamento na parede interna dos orificios arteriais no escoamento em regime laminar no tempo t=0,4s. As FIGs 4.38 (a) e (b) apresentam a tensão de cisalhamento na parede do orificio arterial 4 do cateter desobstruído e obstruído respectivamente. As

FIGs 4.38 (c) e (d) apresentam as imagens do orifio arterial 3 no cateter desobstruído e obstruído respectivamente. As FIGs. 4.38 (e) e (f) apresentam a tensão de cisalhamento na parede do orifico arterial 1 no cateter desobstruído e obstruído respectivamente.

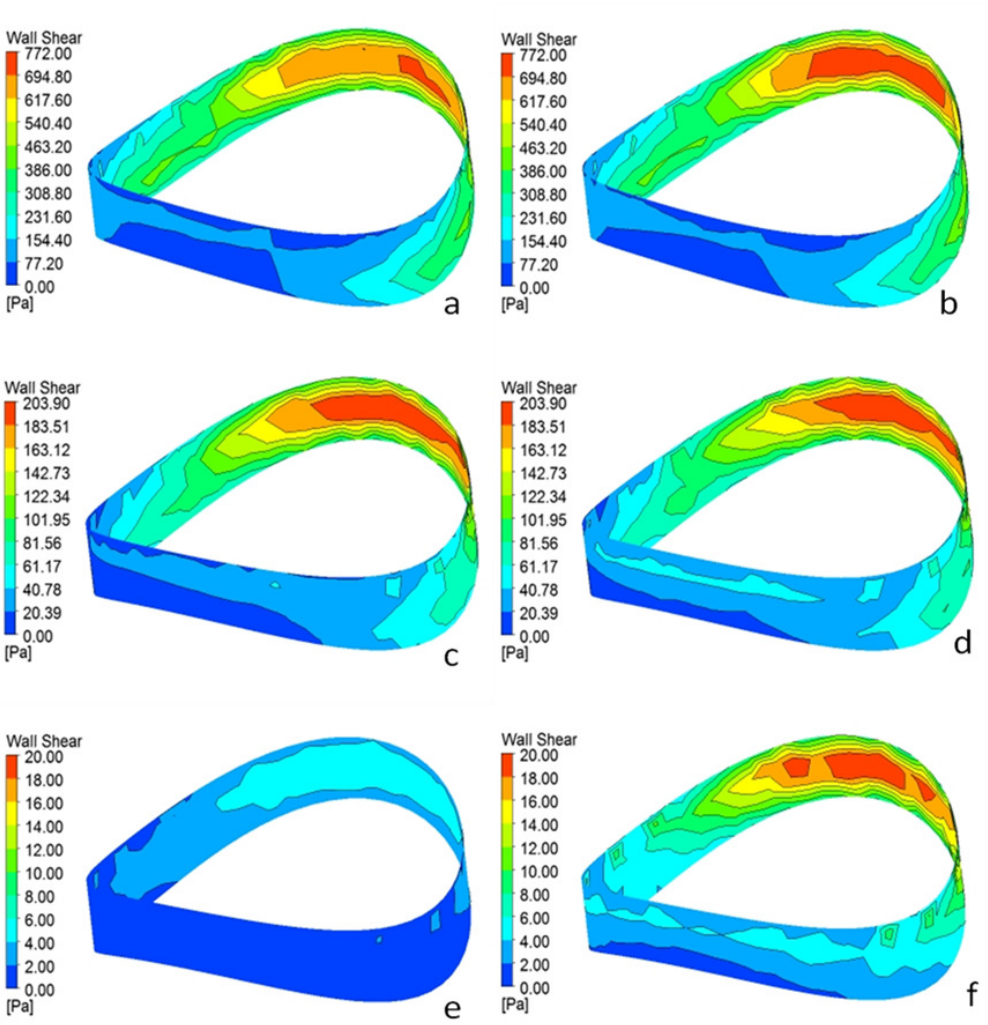


FIGURA 4.38: Tensão de cisalhamento na parede interna dos orificios arteriais no escoamento em regime laminar no tempo t=0,4s. As figuras (a) e (b) apresentam a tensão de cisalhamento na parede do orificio arterial 4 do cateter desobstruído e obstruído respectivamente. As figuras (c) e (d) apresentam as imagens do orifio arterial 3 no cateter desobstruído e obstruído respectivamente. As figuras (e) e (f) apresentam a tensão de cisalhamento na parede do orifico arterial 1 no cateter desobstruído e obstruído respectivamente.

A TAB 4.6 apresenta a média da tensão de cisalhamento na parede e da tensão de deformação na parede interna dos orificios laterais do cateter.

TABELA 4.6

Distribuição da tensão de cisalhamento na parede e da taxa de deformação na parede interna dos orificio laterais durante o ciclo cardiaco.

Parede interna do orificio lateral	**Regime laminar**				**Regime turbulento**			
	Cateter desobstruido	Cateter obstruido	Cateter desobstruido	Cateter obstruido	Cateter desobstruido	Cateter obstruido	Cateter desobstruido	Cateter obstruido
	Tensão de cisalhamento na parede (Pa) (Media ±DP)		Taxa de deformação (s^{-1}) (Media±DP)		Tensão de cisalhamento na parede (Pa) (Media ±DP)		Taxa de deformação (s^{-1}) (Media±DP)	
Orificio venoso 3	87,32±0,22	176,25±0,47	8047,46 ±18,21	12400,02 ±7,40	130,44±0,24	244,10±0,11	6449,06±18,31	10497,04±4,62
Orificio arterial 4	278,42±3,40	284,90±3,52	16002,01±149,0	16003,16±150,12	295,12±3,43	299,13±3,52	11103,04±133,20	11091,01±118,32
Orificio arterial 3	70,99±1,50	72,14±1,54	5302,13±60,12	5795,14±78,10	63,80±1,62	66,72±1,50	3477,07±54,43	3794,06±58,81
Orificio arterial 1	2,50±0,29	7,32±0,33	391,87±39,29	1014,33±32,37	2,01±0,29	5,56±0,32	272,80±33,28	632,12±40,20

No que se refere a tensão de cisalhamento no terceiro orificio venoso, o contorno pode ser visto na FIG. 4.39. As FIGs 4.39(e) e (f) apresentam os contornos no escoamento em regime laminar do cateter não obstruído e obstruído respectivamente. As FIGs 4.39 (g) e (h) mostram os contornos no escoamento em regime turbulento do cateter não obstruído e obstruído respectivamente. As imagens fotográficas mostram o orifício venoso apresentando em seu interior concêntricas camadas de fibrina principalmente na borda do cateter (x).

No centro do trombo (Y) pode ser visto claramente uma cor mais escura devido a maior composição de glóbulos vermelhos nesta área. As micrografias mostram camadas de fibrina ligada na parede do cateter (x) com 13 dias de permanência no interior da veia. A imagem ampliada da FIG 4.39 (b) mostra um exemplo típico das camadas de placa de fibrina ligadas ao polímero. Trombo maduro apresentando uma camada espessa de fibrina na borda do cateter e globulos vermelhos cobertos de rede de fibrina pode ser visto na FIG 4.39 (c). Nesta imagem, o cateter apresentava 16 dias de permanência no interior da veia. A micrografia na FIG 4.39 (d) mostra diferentes arranjos da fibra de fibrina. A seta

de cor branca apresenta fibras de fibrina mais interligadas e espessas do que as fibras apontadas pela seta de cor preta. Nessa região pode ser visto claramente a deposição da rede de fibrinas formando um emaranhado com aparência de uma malha.

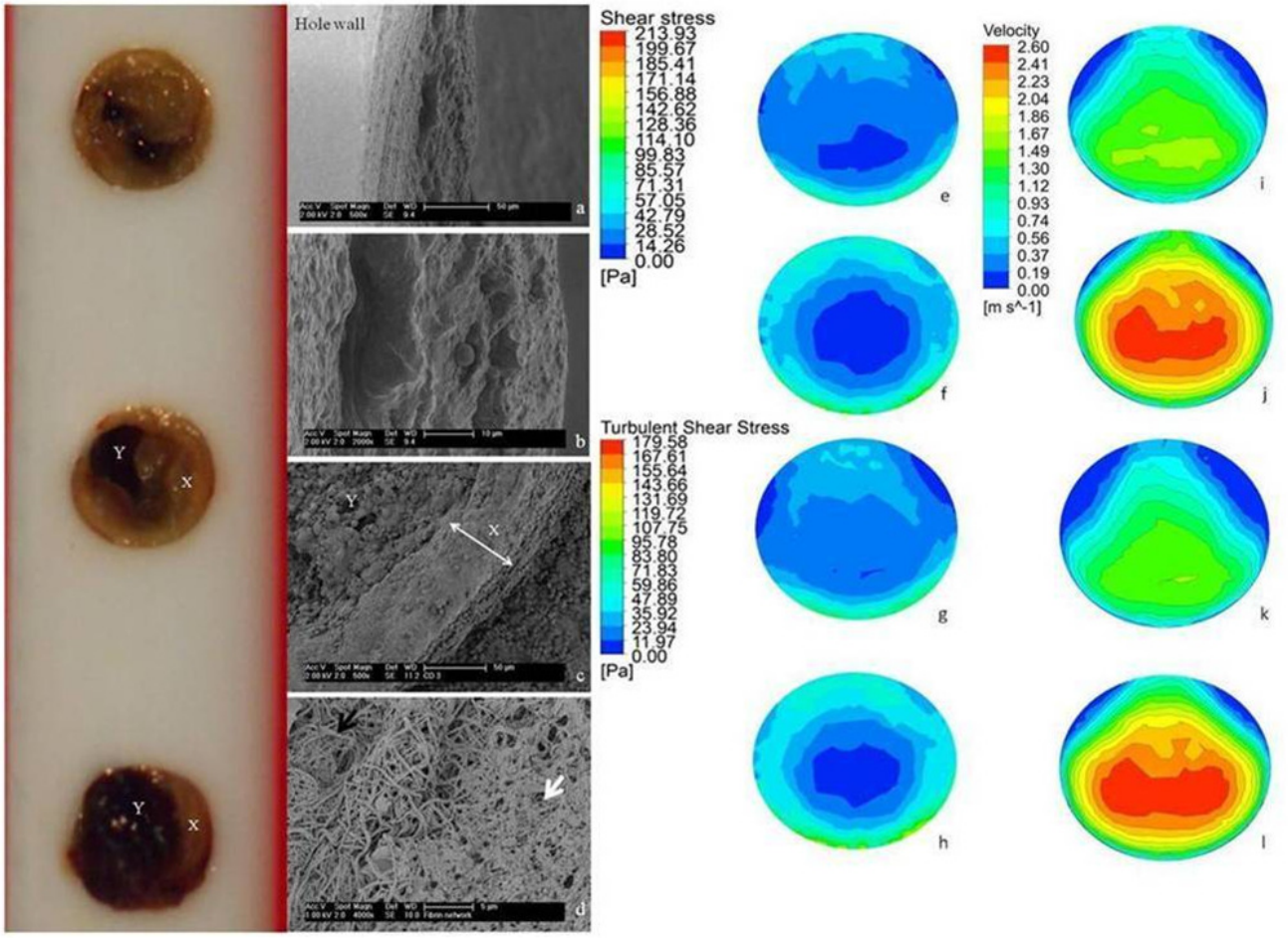


FIGURA 4.39: Distribuição da tensão de cisalhamento no orificio venoso do CVC. Tensão de cisalhamento no escoamento em regime laminar no orifício desobstruído (d) e obstruído (e) do cateter. Tensão de cisalhamento turbulenta no orifício desobstruído(f) e obstruído (g) do cateter. Velocidade no escoamento em regime laminar do cateter desobstruído (h) e obstruído (i). Regime turbulento de um cateter desobstruído (j) e obstruído (l). Fotografia do orifício venoso mostra as camadas de fibrina adsorbida na parede do cateter (a) e (b). Trombo maduro com espessa placa de fibrina na borda do cateter e globulos vermelhos coberto de rede de fibrina no centro (c). Diferentes arranjos da fibra de fibrina (d): a seta de cor branca apresenta fibras de fibrina mais interligadas e espessas e a seta de cor preta apresenta a rede de fibrina formando um emaranhado com aparencia de uma malha. Magnficação original 100x, 500x e 1000x.

Para enteder melhor a distribuição das fibras de fibrina no interior do orificio venoso, a FIG 4.40 apresenta uma imagem em microscopia de varredura de laser de dois fotons, contendo a placa de fibrina aderida à parede interna do cateter, e a partir dela, a rede de fibrinas entrelaçadas em direção ao centro do trombo. A imagem em MEV apresenta a rede de fibrinas entrelaçadas. Pode-se notar que esta rede de fibrina apresenta-se com várias camadas sobrepostas que se interconectam e que podem formar mais tarde uma placa de fibrina. Pode-se inferir que o entrelaçamento desigual das fibras esta relacionado com a perturbação do escoamento venoso, sobretudo, a presença de vórtice, e de recirculação em que predominam variações de tensão de cisalhamento e de taxa de deformação.

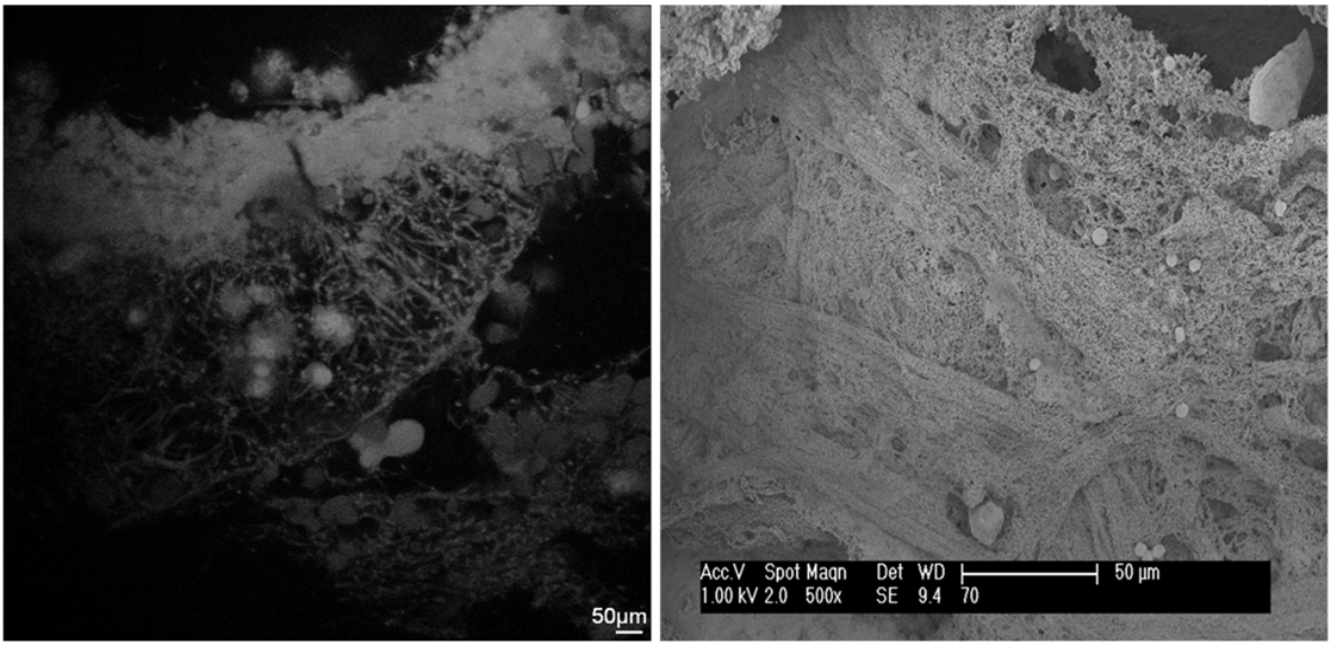


FIGURA 4.40: Microscopia de varredura a laser de dois fotons:placa de fibrina e rede de fibrina em direção ao centro.MEV: rede de fibrina entrelaçadas formando uma placa compacta. Magnificação original 500x.

Os parâmetros hemodinâmicos possibilitam modelar e dar uma conformação à fibrina no interior do orifício venoso de acordo com as condições químicas e mecânicas do escoamento sanguíneo (KHARBOUTLY *et al.*, 2010; BROOS *et al.*, 2011; BAJD *et al.*, 2012). As fibras muitas vezes

apresentam-se finas e outras vezes mais espessas e entrelaçam-se em alguns locais da rede e formam rearranjos variáveis que segue a direção do escoamento.

Um estudo simulou *in vitro*, as condições fisiológicas do sangue contendo plaquetas humanas em uma camera de perfusão revestida com colágeno (GERSH *et al.*, 2010). Esse estudo comparou a orientação das fibras de fibrina no trombo em MEV, com taxas de deformação de 5 s^{-1} e de $20s^{-1}$ (GERSH *et al.*, 2010). A fibrina apresentou-se como uma rede de fibras aleatórias emaranhadas nas taxas de deformação de $5s^{-1}$, enquanto que numa taxa de deformação a $20s^{-1}$ as fibras seguiram a direção horizontal do escoamento, embora algumas ainda apresentaram-se de forma aleatória (GERSH *et al.,* 2010). Vale a pena comentar que, nesse estudo experiemntal *in vitro*, sob determindas condições específicas de controle, as taxas de deformação foram consideradas como baixas a 5 s^{-1} e como altas a $20s^{-1}$.

Além disso não se verificou diferenças siginificativas na média de diâmetro das fibras entre as diferentes taxas de deformação (GERSH *et al.,* 2010). Estudos indicam que o diâmetro das fibras é dependente da concentração de trombina no sangue e que, parâmetros hemodinâmicos como a taxa de deformação, pode não influenciar no diâmetro das fibras (BERNY *et al.*, 2010; LONGSTAFF, 2011; BATEMAN *et al.*, 2012). No presente estudo, as fibras apresentaram um padrão assimétrico de distribuição, seguindo muitas vezes a direção de distúrbio do escoamento e outras vezes a direção perpendicular ao escoamento.

É interessante comparar a estrutura da fibrina no interior do lúmen do cateter e na região externa do orifício venoso. Na FIG 4.41, as três imagens superiores apresentam fibras mais lisas e que seguem a direção longitudinal do escoamento venoso correspondente à direção do escoamento no interior do cateter. Por outro lado, as três imagens inferiores apresentam as camadas de fibrinas mais estruturadas e rugosas. As fibras apresentam emaranhados mais assimétricos e desorganizados.

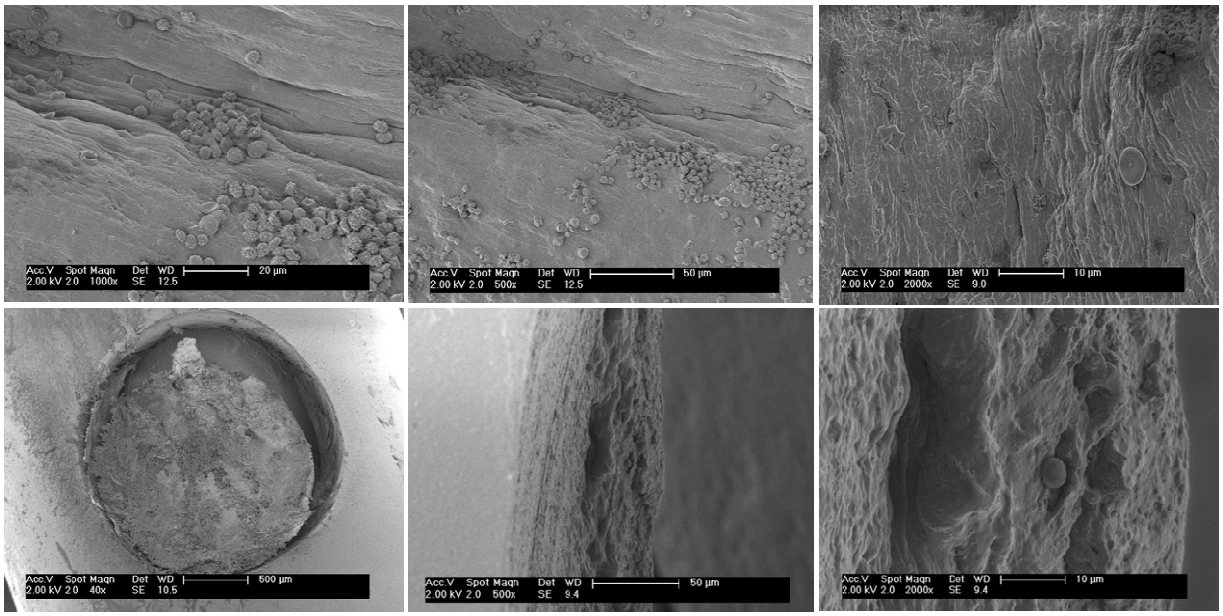


FIGURA 4.41: Distribuição das fibras de fibrina: as três imagens superiores apresentam as fibras mais lisas e seguindo uma direção longitudinal no interior do lumen do cateter. As três imagens inferiores apresentam as fibras de fibrina assimetrica na parede interna do orificio venoso. Magnificação original 40x, 500x,1000x e 2000x.

Os valores de tensão de cisalhamento e da taxa de deformação nos orifícios venosos do CVC estão apresentados na TAB 4.7.

TABELA 4.7

Distribuição da tensão de cisalhamento e da taxa de deformação nos orificios laterais do CVC durante o ciclo cardíaco.

Orificios laterais do CVC	**Regime Laminar**				**Regime Turbulento**			
	Cateter desobstruído	Cateter obstruido	Cateter desobstruido	Cateter obstruido	Cateter desobstruido	Cateter obstruido	Cateter desobstruido	Cateter obstruido
	Tensão de cisalhamento (Pa) (Média ±DP)		Taxa de deformação (s^{-1}) (Média±DP)		Tensão de cisalhamento turbulenta (Pa) (Média ±DP)		Taxa de deformação (s^{-1}) (Média±DP)	
Orificio venoso 3	27,12±0,03	35,04±0,01	4510±3	5804 ±2	24,08±0,02	34,12±0,009	4033 ±2	5627±1
Orificio arterial 4	35,20±0,32	35,25±0,32	5793±45	5814±55	27,80±0,21	27,87±0,22	4582±48	45961±46
Orificio arterial 3	13,57±0,16	14,44±0,12	2198±29	2381±32	10,21±0,02	10,15±0,02	1598±12	1713±14
Orificio arterial 1	1,30±0,10	3,75±0,80	179±26	480±16	0,96±0,08	2,05±0,06	115.34±21	310±15
Orifio central	10,92±0,04	17,13±0,02	1758±9	2790±5	12,48±0,04	18,50±0,02	2014±7	3019±4

A FIG 4.42 apresenta os contornos das tensões de cisalhamento nos orificios arteriais no escoamento em regime laminar. As FIGs 4.42 (a) e (b) representam a tensão de cisalhamento no orificio arterial 4 de um cateter obstruído e desobstruído respectivamente. As FIGs 4.42 (c) e (d)

representam os contornos do orificio arterial 3 do cateter desobstruído e obstruído respectivamente. As FIGs 4.42 (e) e (f) apresentam os contornos no orificio arterial 1 de um cateter desobstruído e obstruído respectivamente.

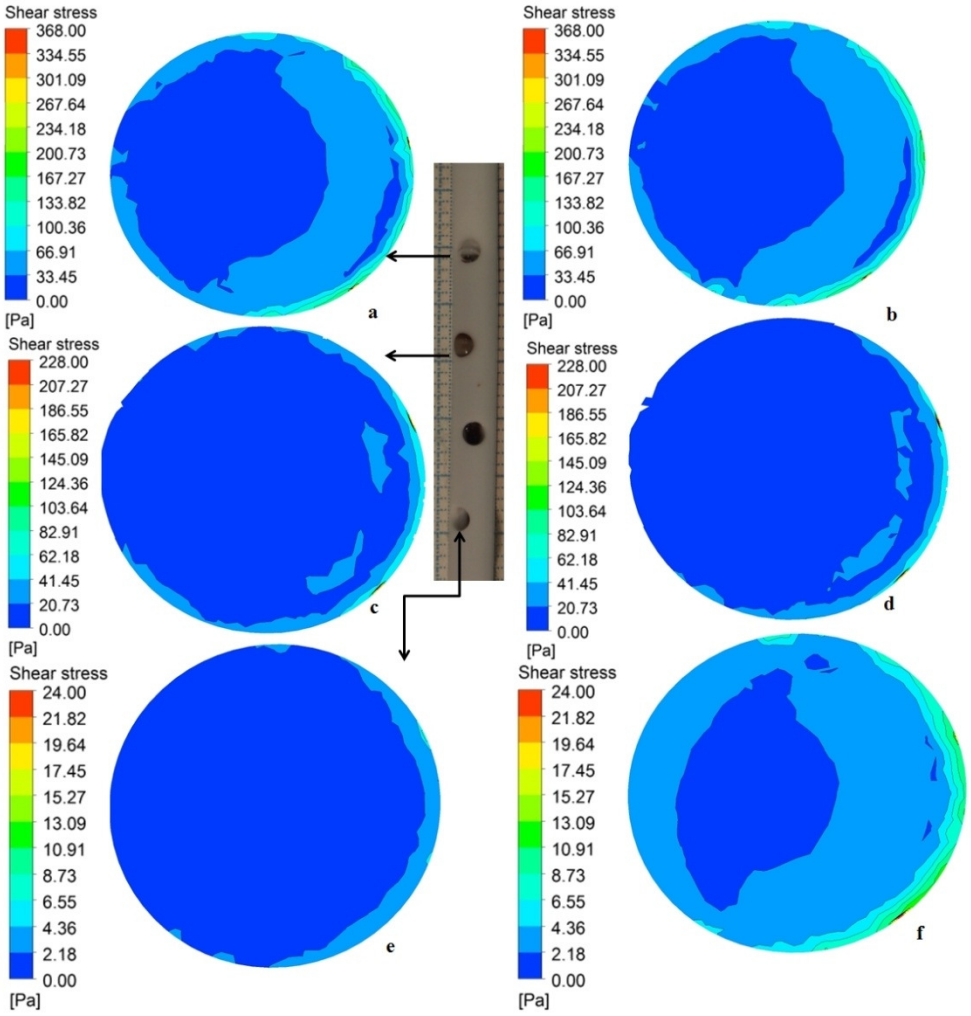


FIGURA 4.42: Distribuição dos contornos das tensões de cisalhamento nos orificios arteriais no escoamento em regime laminar (t=0,4s). Imagens (a) e (b) representam a tensão de cisalhamento no orifício arterial 4 de um cateter obstruído e desobstruído respectivamente. Imagens (c) e (d) representam os contornos do orifício arterial 3 do cateter desobstruído e obstruído respectivamente.Imagens (e) e (f)apresentam os contornos no orifício arterial 1 de um cateter desobstruído e obstruído respectivamente.

No que se refere à tensão de cisalhamento na parede interna do orifício venoso, observou-se um aumento de 50,46% no orifício venoso 3 no regime laminar quando o cateter foi parciamente obstruído e cerca de 46,57% no regime turbulento. O aumento médio da tensão de cisalhamento na parede ajuda a compreender o rápido processo de adsorção das camadas de fibrina na parede interna do orifício venoso. Altos valores de tensão de cisalhamento (10-800 Pa) na parede induz mudanças conformacionais do fibrinogênio adsorvido no polímero, aumentando a área de superfície de ligação entre o fibrinogênio e o receptor integrina localizado na membrana das plaquetas (NESBIT *et al.*, 2009; NEEVES *et al.*, 2010; SHERIFF *et al.*, 2010). Este rearranjo de sítios de adesão focais resulta em elevada ativação de plaquetas e possível aumento da placa de fibrina alinhada na direção do escoamento ligada à parede interna do orifício venoso como mostrado na FIG 4.37g.

No presente estudo, o sangue está em contato com o material polimérico, e nesta condição, a adsorção de plaquetas aumenta com o aumento da taxa de deformação e maior será interação da fibrina com a parede do biomaterial (WU *et al.*, 2008). A taxa de deformação foi avaliada em condições dinâmicas, na presença de distúrbio do escoamento em contato com o CVC. Dessa forma, como os valores de taxa de deformação no que diz respeito à abordagem deste estudo, é desconhecido na literatura, os valores foram discutidos de acordo com a ação fisiológica do fibrinogênio e do vWf associado ao transporte de plaquetas em direção à superfície polimérica. De acordo com esta ação fisiológica, com o aumento da taxa de deformação mais plaquetas serão transportadas para a parede do vaso e maior será a concentração de fibrinas que circunda o trombo (RUMBAUT; THIAGARAJAN, 2010; NEEVES *et al.*, 2010; BROOS *et al.*, 2011; KONINGS *et al.*, 2011,WELLINGS, 2011; MAZUR *et al.*, 2013).

Quando a taxa de deformação é maior que $1300s^{-1}$ a adesão de plaquetas é controlada por reações cinéticas da interação entre os receptores de plaquetas com as proteínas que foram adsorbidas na parede do cateter (RUMBAUT; THIAGARAJAN, 2010; NEEVES *et al.*, 2010; BROOS *et al*., 2011). Consequentemente altos valores de taxa de deformação poderá levar a um aumento da ativação de plaquetas e subsequente desenvolvimento de fibrina. No presente estudo, todos os orifícios, com exceção do orifício arterial 1, apresentaram valores de taxa de deformação, na sua parede interna, maiores que $1300s^{-1}$.

A taxa de deformação tipicamente maior que $10\ 000s^{-1}$, faz com que as ligações entre o receptor de glicoproteina presente nas membranas das plaquetas e o vWf sejam as únicas capazes de recrutar rapidamente as plaquetas quando a taxa de deformação é alta, na ausência de nenhum ouro ativador de plaquetas (RUMBAUT;THIAGARAJAN, 2010; NEEVES *et al.*, 2010; BROOS *et al.*, 2011; YUAN *et al.,* 2012). Neste estudo, a taxa de deformação na parede interna do orifício venoso de um cateter obstruído parcialmente e do orificio arterial 4 em ambos os tipos de cateteres apresentaram taxa de deformação maiores que $10\ 000s^{-1}$ em ambos os regimes laminares e turbulentos. Isto pode ser uma explicação plausível para o estabelecimento de adicionais ligações que ativam as plaquetas, levando o desenvolvimento mais rápido da fibrina nestes orifícios e subsequente formação de trombos.

Cabe ressaltar ainda que, sob baixas taxas de deformação o vWf adsorvido pelos polímeros, apresentam uma conformação globular, mas com a alta tensão de cisalhamento ele é capaz de extender a sua conformação globular e passa a ser orientado na direção da taxa de deformação sendo capaz de recruturar as plaquetas que fluem sob altas condições de taxa de deformação (WU *et al.*, 2008; COSEMANS *et al.*, 2011; YUAN *et al.*, 2012).

Por outro lado, a taxas de deformação menores que $1000s^{-1}$ a agregação plaquetária é mediada pela interação do fibrinogênio e o receptor integrina contido nas plaquetas das membranas (RUMBAUT; THIAGARAJAN, 2010; NEEVES *et al.*, 2010; BROOS *et al.*, 2011; KONINGS *et al.*, 2011, WELLINGS, 2011). Este processo independe das ligações contendo o vWf, embora um estudo *in vitro* mostrou que a ativação plaquetária pode ocorrer por meio de ligações entre os receptores de plaquetas e vWf com uma taxa de deformação de $250s^{-1}$ como complementar as ligações com fibrinogênio (COSEMANS *et al.*, 2011).

Dessa forma, mesmo a baixa condições de taxa de deformação o vWf pode atuar como complementar às ligações entre fibrinogênio e as plaquetas dependendo das condições do escoamento. Sabe-se que o fibrinogênio é a proteína mais propensa a adsorção em poliméricos e a principal mediadora da adesão de plaquetas (CHEN *et al.*, 2008; XU *et al.,* 2009). Assim o fibrinogênio rapidamente é absorvido pelo material inserido no sangue desecandeando de forma continua e ativa a formação de fibrina. Quando a superfície polimérica é introduzida no sangue o fibrinogênio é adsorvido, e sua conformação é modificada, expondo sequências de peptídeos funcionais expostas na superfície (XU *et al.*, 2009; THEVENOT;TANG, 2008). Essas sequências de peptideos propiciam a interação com maior quantidade de receptores de plaquetas, o qual leva a sua adesão, ativação e agregação.

Um estudo realizado *in vitro* testou a adsorção do fibrinogênio a um tubo de polietileno sob condições de fluxo não estáticas (KWAK *et al.*, 2005). Verificou-se que, a adsorção das plaquetas ao polietileno aumentou com o aumento da taxa de deformação acima de $500s^{-1}$. Outro estudo avaliou *in vitro* o efeito do fibrinogenio e do vWf quando adsorvidos em polietileno sob condições de fluxo não estático (WU *et al.*, 2008). Os resultados mostraram que sob alta taxa de deformação ($>500s^{-1}$) ambos

fibringênio e vWf são adsorvidos com maior facilidade na superfície do material. Sendo assim, neste estudo, pode-se induzir que nos cateteres que são obstruídos a adesão de plaquetas no material e consequente formação de fibrina serão maiores, uma vez que, as taxas de deformação apresentaram-se maiores. De fato, sob elevadas taxas de deformação ($1000s^{-1}$-$10.000s^{-1}$) as plaquetas são reguladas sob a ação cooperativa das ligações glicoproteina (GPIbα)-vWf e integrina (αIIbβ3)-fibrinogenio (RUMBAUT; THIAGARAJAN, 2010; NEEVES *et al.*, 2010; BROOS *et al*., 2011;YUAN *et al.,* 2012).

No que se refere aos valores médios da tensão de cisalhamento na tabela 2, o orifício venoso 3, central e o arterial 1 apresentou maiores variações nos valores quando o CVC estava obstruído. As tensões de cisalhamento no orifício venoso e no orifício arterial 4 apresentaram valores mais altos quando comparados aos outros orifícios. Entretanto, estas diferenças apresentaram-se menores quando comparados aos valores de tensão de cisalhamento na superficie interna dos orifícios laterais, local em que a fibrina inicialmente se liga e se desenvolve. Altos valores de tensão de cisalhamento (10,0 – 800,0 Pa) são conhecidos por causar ativação das plaquetas em breve exposições de poucos milisegundos (SHERIFF *et al.*, 2010).

Neste estudo, com exceção do orifício arterial 1, todos os outros orifícios laterais manteram um limiar elevado de tensão, uma vez que, altos valores de tensão de cisalhamento são essenciais para uma eficiente hemodiálise. Esses orifícios laterais poderiam ser classificados como regiões críticas potenciais para a aceleração da ativação de plaquetas e propagação da fibrina. Entretanto, um estudo avaliou *in vitro* a trombogenicidade sob condições de vários ciclos de fluxo não estáveis e verificou que, valores de tensão de cisalhamento em condições de hemostasia venosa (1,4 to 6,0 Pa) são capazes

de aumentar a ativação e agregação plaquetária com o aumento do tempo de exposição à tensão de cisalhamento sob qualquer magnitude (RUBENSTEIN; YIN, 2010).

Outro estudo investigou *in vitro* o efeito da tensão de cisalhamento no processo de ativação de plaquetas na trombogenicidade em condições de fluxo pulsátil (YIN *et al.*, 2011). Os resultados mostraram que sob curta exposição 0,1s a cada 90 segundos, a uma tensão de cisalhamento de 6,0 Pa não induziu a mudanças na ativação das plaquetas, por outro lado, a longa exposição (30 minutos) levou a uma consideravel aumento de trombinas e aceleração na produção de plaquetas.

Um estudo avaliou *in vitro* a suscetibilidade à deposição de trombos em áreas de superfície artificiais que são implantadas em pacientes e comparou a distribuição da tensão de cisalhamento e de taxa de deformação com estudos fluido dinâmico computacional (KIM *et al.*, 2012). O estudo concluiu que, a deposição de trombos na superfície pode-se iniciar com pequenos valores de tensão de cisalhamento (< 0,41 Pa) e com baixa taxa de deformação (< 54 s^{-1}) quando o escoamento sanguíneo está em contato continuo com materiais poliméricos implantáveis.

No presente estudo, encontraram-se várias regiões de ponto de estagnação visto nos vetores de velocidade inseridos no escoamento. Tais pontos de estagnação geraram baixos valores de tensões de cisalhamento e, ao mesmo tempo, altos valores de tensão de cisalhamento, sobretudo, na saída dos orifícios laterais.

Sendo assim, o desenvolvimento e conformação da fibrina, podem estar asociado a ambas as condições de tensão de cisalhamento, embora os resultados indiquem que a alta tensão de cisalhamento pode ser o precursor para a formação de trombos no interior dos cateteres de hemodiálise. Além disso, regiões marcadas por recirculação e separação de escoamento contribuem para um aumento do tempo

de permanência dos componentes do sangue na superfície do cateter, o qual propicia a adsorção de proteinas e ativação das plaquetas (CHIU; CHIEN, 2011; KIM *et al.*, 2012).

Um estudo investigou *in vitro* a estimulação do desenvolvimento do trombo em válvulas cardíacas implantáveis causadas, indiscutivelmente pela ativação de plaquetas (SHERIFF *et al.*, 2010). As plaquetas quando foram expostas a altas tensões de cisalhamento (200-240 Pa), se tornaram ativadas em curtos períodos de tempo (40s) e não recuperaram a sua atividade normal de repouso quando submetidas a subsequente condições de baixa tensão de cisalhamento. Esse comportamento de sensibilização poderia explicar as complicações tromboembólicas que acontecem em válvulas cardíacas (SHERIFF *et al.*, 2010).

Esses achados também podem fornecer uma idéia da complexidade da dinâmica do escoamento quando o CVC permanece no interior da veia o qual inclui combinadas regiões de alta tensão de cisalhamento e recirculação. A análise em MEV apresentadas na FIG 4.41 possibilitou distinguir diferentes estruturas de fibrina: a *placa de fibrina* (mais espessa com fibras densas dispostas ao redor do trombo) o qual foram vistas ligadas à superfície interna do orifício venoso, apresentando varias camadas sobrepostas e *rede de fibrina* (malha de fibrina, apresentando emaranhado de fibras finas e espessas) como mostrado na FIG 4.41 (d).

A diferença na disposição das fibras pode indicar diferentes valores de tensão de cisalhamento e de taxa de deformação o qual favoreceram a ativação da coagulação por meio da adsorção polimérica, alto e baixo valores de tensão de cisalhamento e de taxa de deformação. Estudos recentes *in vitro* têm demonstrado por meio de MEV o processo de polimerização da fibrina no interior do trombo no que diz respeito à correlação entre a variação na taxa de deformação e o número de fibras gerado ou a associação dos fatores de coagulação e a espessura dessas fibras (CAMPBELL *et al.*, 2010; GERSH *et*

al., 2010; SILVAIN *et al.,* 2011; MAZUR *et al.*, 2013). Estudo recente *in vitro* utilizou a MEV para comparar o alinhamento da fibrina sob condições de estase sanguínea e em condições de grande circulação de fluxo (LI *et al.*, 2012). Entretanto, este é o primeiro estudo que descreveu diferentes estruturas de fibrinas no interior do trombo *in vivo* e discutiu a influência da tensão de cisalhamento e da taxa de deformação na sua conformação e estrutura.

Velocidade

A média de velocidade na saída do orifício venoso foi de 1,7902±0,0009 m/s e de 1,7421±0,0007 m/s para o escoamento em regime laminar e turbulento em um cateter obstruído respectivamente. A FIG 4.39 apresentou o contorno da velocidade no escoamento em regime laminar para um cateter desobstruído (FIG 4.39(i)) e obstruído (FIG 4.39 (j)) (t=0.4s). A FIG 4.39 (k) e 4.39 (l) apresentou o escoamento em regime turbulento num cateter desobstruído e obstruído respectivamente. Para um cateter desobstruído a média de velocidade durante o ciclo cardíaco foi de 0, 992±0,001m/s para o escoamento em regime laminar e 0,858±0,001m/s para o escoamento em regime turbulento. A FIG 4.43 apresenta os contornos de velocidade nos três planos inseridos na região anterior, mediana e posterior da região venosa obstruída. As FIGs 4.43 (e) e (g) mostraram os contornos de velocidade no cateter obstruído nos regimes laminares e turbulentos respectivamente.

Vale à pena comentar que, os valores encontrados de velocidade foram os valores médios obtidos provenientes de toda a área do plano que foi inserido no orifício venoso. Sendo assim justifica-se a pequena variação do desvio padrão nos valores de velocidade durante o ciclo cardíaco de 0,8s.

Os GRAs 4.43(a) e (c) correspondem ao perfil de velocidade do plano indicado nas FIGs 4.43(e) e (g). As FIGs 4.43(f) e (h) mostram os contornos de velocidade no cateter desobstruído nos regimes laminares e turbulentos respectivamente. Essas imagens correspondem aos GRAs. 4.43(b) e (d) o qual apresentam o perfil de velocidade da região posterior à obstrução.

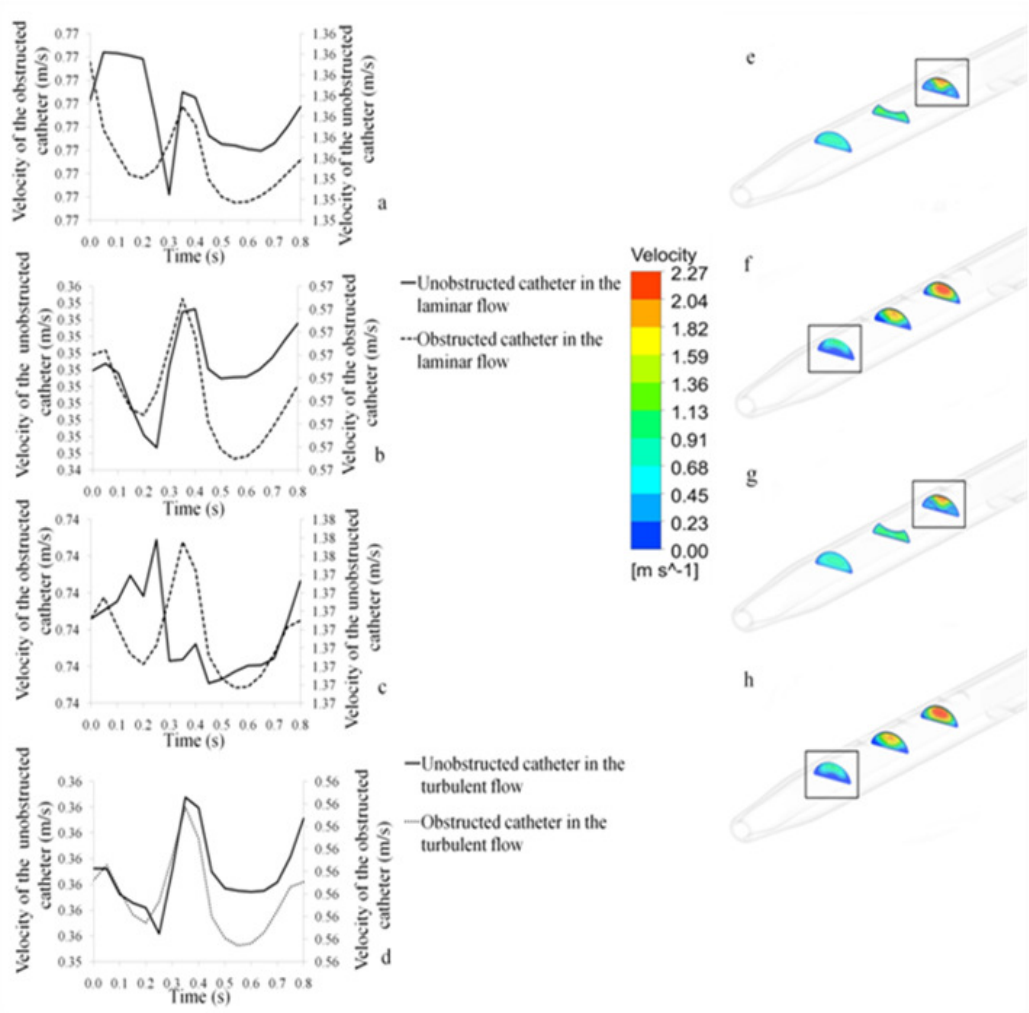


FIGURA 4.43: Distribuição da velocidade nos planos inseridos na região anterior, mediana e posterior à obstrução venosa. As imagens (e) e (f) apresentam planos inseridos em cateteres obstruídos e desobstruídos respectivamente em regime laminar. As imagens(g) e (h) apresentam planos inseridos em cateteres obstruídos e desobstruídos respectivamente em regime turbulento. Os gráficos a e c correspondem ao perfil de velocidade do plano selecionado inseridos nas imagens (e) e (g). Os gráficos (b) e (d) correspondem ao perfil de velocidade do plano posterior à obstrução nas imagens (b) e (d).

A TAB 4.8 apresenta a média de velocidade nos regimes laminares e turbulentos no interior dos planos inseridos na região anterior, mediana e posterior à obstrução venosa.

TABELA 4.8

Distribuição dos valores de velocidade nos regimes laminares e turbulentos no interior dos planos inseridos na região anterior, mediana e posterior à obstrução venosa.

Planos	Regime laminar		Regime turbulento	
	Cateter Desobstruído	Cateter Obstruído	Cateter Desbstruído	Cateter Obstruído
	Velocidade (m/s) (Média±DP)		Velocidade (m/s) (Média±DP)	
Anterior	1,357±0,002	0,7710 ±0,0008	1,371±0,001	0,7412±0,0005
Mediana	0,932±0,002	0,812±0,005	0,954±0,002	0,792±0,005
Posterior	0,354±0,002	0,573±0,001	0,361±0,001	0,5610 ±0,0008

De acordo coma TAB 4.8 observou-se que a velocidade média diminuiu com a obstrução em ambos os escoamentos no interior do cateter. O plano inserido na região posterior à obstrução venosa apresentou um aumento da velocidade média com a introdução do CVC parcialmente obstruído. Além disso, os valores médios de velocidade, praticamente não variaram entre os regimes laminares e turbulentos.

A FIG 4.44 (a) apresenta o contorno de velocidade no orifício situado na ponta do cateter desobstruído e de um cateter obstruído (FIG 4.44(b)) quando em regime de escoamento laminar no tempo t=0,4s. Na ponta do cateter a velocidade aumentou de 0,942 ±0,005 m/s considerando um cateter desobstruído para 1,673± 0,003 m/s no cateter obstruído parcialmente. Um plano invertido foi inserido na ponta do cateter obstruido (FIG 4.44 (d)) e desobstruído (FIG 4.44 (c)) em regime laminar.

A média de velocidade para o cateter desobstruído foi de 0,0751 ±0,0042m/s e de 0,073 ±0,007m/s para o cateter obstruído. A presença do vórtice sugeriu a presença de recirculação nesta região, o qual pode ser visto claramente nas FIGs 4.44 (c) e 4.44 (d). Ressalta-se que, embora as imagens tenham sido feitas no tempo de pico da sístole (t=0,4s) durante todo o ciclo cardíaco observou-se apresença de vórtice próximo à parede do vaso.

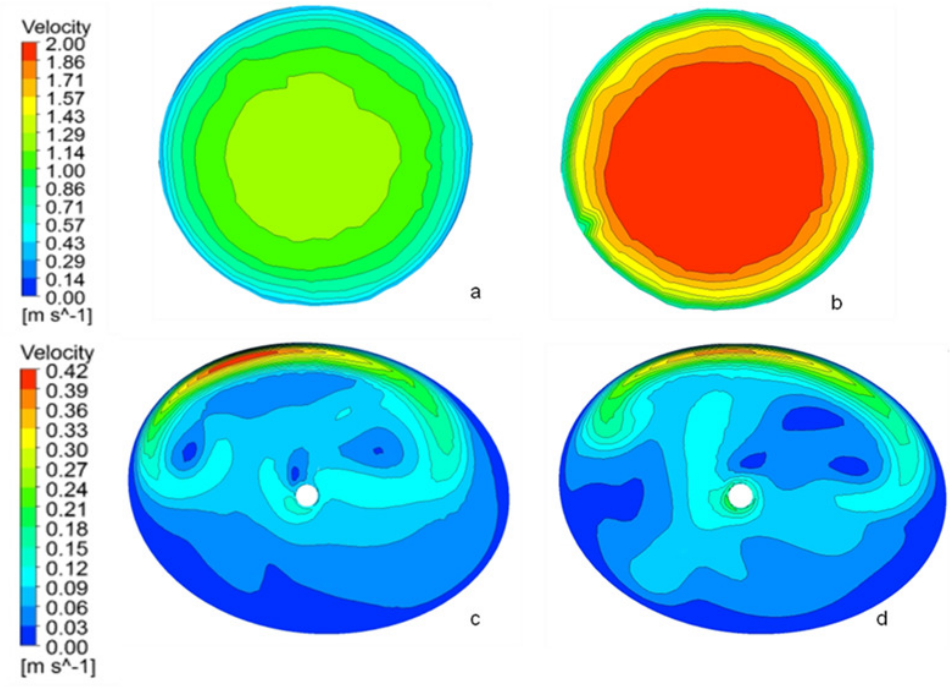


FIGURA 4.44: Distribuição da velocidade no orifício situado na ponta central do cateter desobstruído (a) e parcialmente obstruído (b) no escoamento em regime laminar. Planos invertidos inseridos na ponta do cateter desobstruído (c) e obstruído (d).

Interessante observar que, quando inseridos planos invertidos na região de obstrução venosa e arterial, as velocidades na região de obstrução venosa apresentaram maiores como mostra a FIG 4.45 em regime laminar (t=0,4s). Nota-se a presença do vórtice na parede venosa do plano inserido no cateter obstruído.

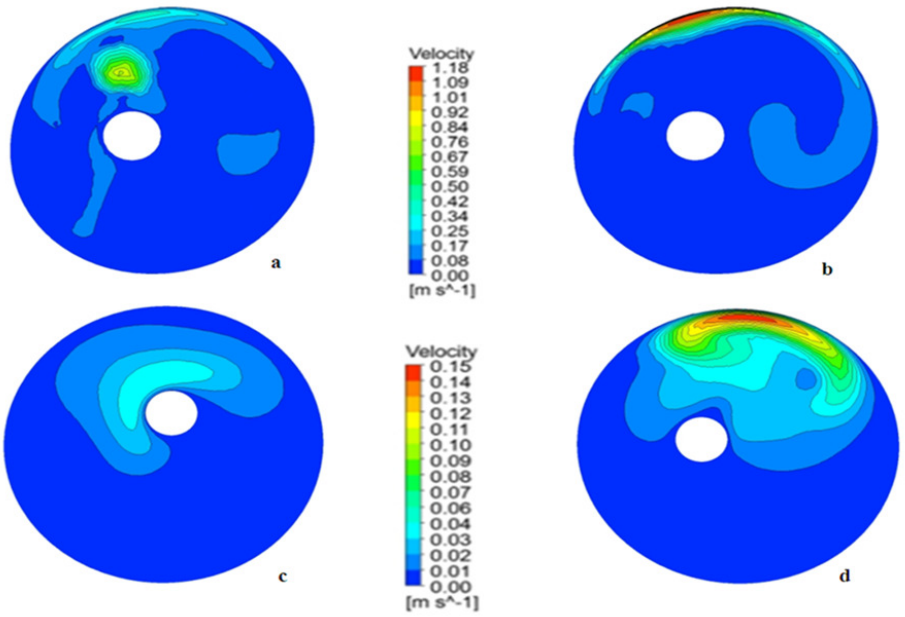


FIGURA 4.45: Distribuição da velocidade no plano invertido em região de obstrução venosa, no cateter desobstruído (a) e obstruído (b). Plano invertido inserido em região de obstrução arterial no cateter desobstruído (c) e obstruído (d).

A velocidade média do plano inserido na região de orifício lateral venoso foi de 0,088±0,013 m/s no escoamento laminar em que, era ausente a obstrução, e de 0,081 ±0,040 m/s na presença de obstrução parcial no cateter. Quanto ao plano situado na região de orifício arterial (regime laminar), verificou-se uma média de velocidade de 0,037m/s ± 0,009m/s no cateter sem obstrução e uma média de velocidade de 0,021±0,005m/s no plano localizado no orifício arterial obstruído.

A TAB 4.9 apresenta os valores de velocidade dos orifícios arteriais nos regimes laminares e turbulentos.

TABELA 4.9

Distribuição dos valores de velocidade nos orificios laterais arteriais nos regimes laminares e turbulentos durante o ciclo cardíaco.

Orificios arteriais	**Regime Laminar**		**Regime turbulento**	
	Cateter desobstruido	Cateter obstruido	Cateter desobstruido	Cateter obstruido
	Velocidade (m/s) (Média ±DP)		Velocidade (m/s) (Média ±DP)	
Orificioarterial 4	1,853±0,015	1,851±0,013	1,590±0,014	1,591±0,013
Orificio arterial 3	0,682±0,009	0,793±0,009	0,542±0,006	0,622±0,007
Orificio arterial 1	0,075±0,007	0,17±0,006	0,052±0,006	0,122±0,003

A velocidade no orifício arterial 1 aumentou em 55,89% quando o cateter foi obstruido no escoamento em regime laminar. Os outros orifícios não apresentaram diferenças significativas quando na presença da obstrução. A velocidade no orificio arterial 4 apresentou-se com maiores valores no cateter obstruído e desobstruído.

Um estudo numérico fluido dinâmico, comparou cateteres de aspiração de trombos que continham orifícios laterais com um cateter que possuia apenas um orificio central (PENNATI *et al.*, 2010). Verificou-se que, o orifício mais próximo do *hub* do cateter apresentou maior velocidade e vazão na entrada , seguido pelo segundo e terceiro orifício. Em acordo com esses resultados, o orifício lateral, mais proximo do *hub* do cateter, que seria o orifício arterial 4, também apresentou maior velocidade quando na aspiração do fluido.

Sendo assim, no processo de aspiração de fluido na hemodiálise, pequena quantidade de fluxo é aspirada do orificio arterial 1, permanecendo com pequenos valores de velocidade durante todo o ciclo cardíaco.

Pode-se inferir que, neste orifício existe grande probabilidade de formação de trombo, uma vez que, os parâmetros hemodinâmicos deste orifício diferem dos outros tanto no cateter obstruído quanto no desobstruído. Os valores de velocidade, taxa de deformação e de tensão de cisalhamento diferenciam dos demais orifícios. As plaquetas podem acumular neste local, devido à diferença de transporte de massa em relação aos outros orifícios. Sendo assim, a área de separação de escoamento e de recirculação será muito maior na região próxima a este orifício quando comparado aos outros

orifícios laterais. Nas FIGs 4.34 e 4.35, as áreas de recirculação podem ser claramente vistas próxima ao orificio arterial 1 devido à formação de um vórtice no cateter desobstruído.

No que diz respeito à velocidade no orifício venoso 3,verificou-se um aumento de 47,89% no cateter obstruído no escoamento em regime laminar e um aumento de 43,71% no escoamento em regime turbulento. Nas FIGs 4.39 e 4.44 foi visto que próximo à parede do orifício lateral, a velocidade permanece com baixos valores durante o ciclo cardíaco. É conhecido que, as regiões de baixa velocidade no escoamento possibilita o remodelamento da fibrina e o desenvolvimento de trombos (SUGITA, 2009; RUMBAUT; THIAGARAJAN, 2010; TOKAREV *et al.*, 2011; RUBENTEIN;YIN, 2010).

A taxa de deformação está relacionada com a velocidade do escoamento, incluindo a velocidade das células que fluem nas camadas adjacentes da parede interna do orifício do cateter (BROOS *et al.*, 2011; WELLINGS, 2011). Neste contexto, a velocidade do sangue próximo à parede é menor que o centro do orifício e consequentemente cria um efeito de corte entre as camadas adjacentes do fluido.

Vale a pena comentar que, as células sanguíneas vermelhas combinadas com a taxa de deformação desempenharam uma importante influência na distribuição das plaquetas no interior do orifício venoso e pode complementar o modelamento das camadas de fibrina na região interna do orifício. O transporte das plaquetas é guiado pela taxa de deformação no sangue combinado com a presença das células sanguíneas vermelhas (MORI *et al.*, 2008; BROOS *et al.*, 2011; WELLINGS, 2011). Com o aumento da velocidade e da taxa de deformação, as células sanguíneas vermelhas migram em direção ao centro do orifício enquanto que as plaquetas são transportadas para a parede do orifício devido às colisões com as células sanguíneas vermelhas (BROOS *et al.*, 2011; WELLINGS, 2011, CHIU; CHIEN, 2011; WANG *et al.*, 2012).

Como consequência, próximo à parede do cateter pode-se encontrar uma maior concentração de plaquetas quando comparados ao centro do cateter. As imagens realizadas em MEV no presente estudo, possibilitou observar grande quantidade de plaquetas ligadas à fibrina, aderidas à parede do cateter quando comparada à região mais central do trombo como mostra a FIG 4.46.

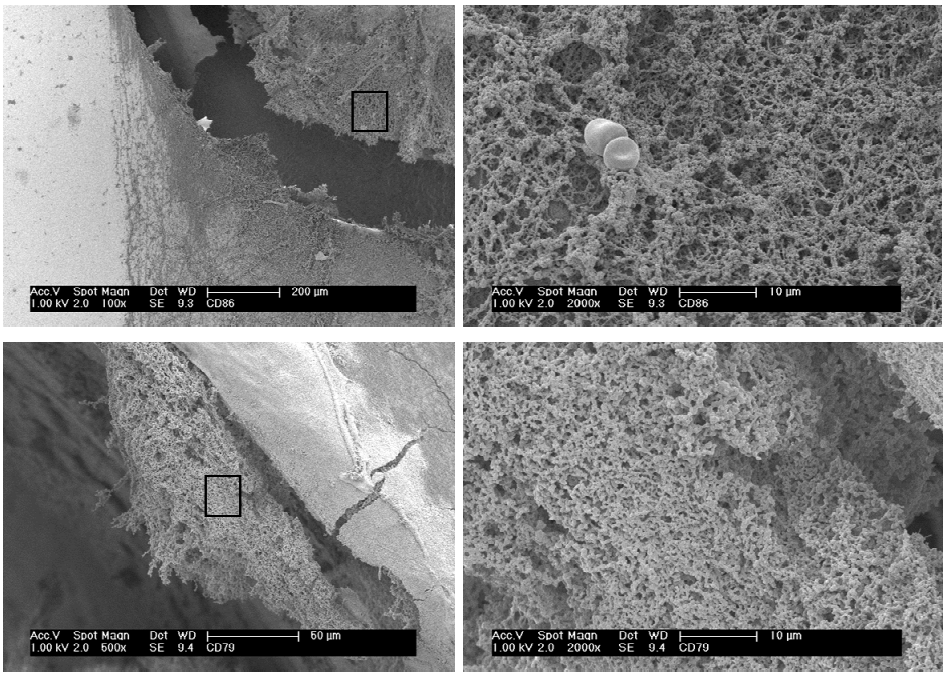


FIGURA 4.46: Distribuição das fibras de fibrina aderidas ao cateter. As imagens ampliadas apresentam as plaquetas aderidas às fibras de fibrina em grande quantidade na borda do cateter. Magnificação original 100x, 500x e 2000x.

Pressão

A TAB 4.10 apresenta a distribuição da pressão nos orificios laterais do CVC.

TABELA 4.10
Distribuição dos valores de pressão nos orficios laterais do CVC.

	Regime laminar		**Regime turbulento**	
Orifícios laterais do CVC	Cateter desobstruído	Cateter obstruído	Cateter desobstruído	Cateter obstruído
	Pressão (Pa) Mediana (mínimo-máximo)		Pressão (Pa) Mediana (mínimo-máximo)	
Orifício venoso 3	1487 (1082 - 2556)	3215(2808-4286)	1353 (944- 2420)	3199 (2793- 4271)
Orifício arterial 4	-247(-655 - 809)	-276 (-681-780)	-59(-305 –1004)	-78(-323-985)
Orifício arterial3	400 (-6 -1452)	374(-27-1448)	443 (34 -1516)	425(18-1497)
Orifício arterial 1	525(316-1595)	408 (109-1590)	524(116-1598)	520(114 -1596)
Orifício central	1056(649 - 2120)	2163(1557 – 3231)	1246 (885-2201)	2102 (1858-3172)

Com relação aos orifícios laterais de saída (venosos e da ponta central), a pressão aumentou de 53,74% no orifício venoso 3 quando o cateter foi obstruído, e aumentou cerca de 51,18% na ponta do cateter. Portanto, cateteres obstruídos parcialmente, apresentaram a pressão de saída elevada e poderiam estimular o desenvolvimento de trombo mural na veia, isto é, trombos que se desenvolvem inicialmente na parede da veia (CHIEN; HU, 2008; LEE *et al.*, 2012).

Sabe-se que, o aumento de pressão nas células endoteliais provoca ativação das plaquetas devido à destruição de células endoteliais (PENNATI *et al.*, 2010; RUBENSTEIN; YIN, 2010). O trombo pode se desenvolver e se ligar na parede da veia no ponto de contato do orifício venoso e a bainha de fibrina formada poderia se propagar da ponta do cateter e se extender em todo o comprimento do cateter (RAUTH *et al.*, 2008; CAMPBELL *et al.*, 2010). Este processo poderia ser outra via de ativação da cascata de coagulação para a formação de trombos no interior dos orifícios venosos devido aos estímulos mecânicos na parede do vaso. Um estudo avaliou a performance de uma canula venosa com e sem a presença de orifícios laterais por meio de um estudo fluido dinâmico computacional (PARK, 2012).

De acordo com o estudo as canulas introduzidas no fluido causavam um distúrbio no escoamento e davam início a variações não fisiológicas nos valores de pressão e tensão de cisalhmento. Além disso, com o aumento do número de orifícios laterais ocorreu uma redução da carga mecânica sob as células. O efeito acumulativo de uma pressão alta nas células levam a um estresse mecânico sob as células e a consequente danos clínicos ao paciente, como a formação do trombo mural (PARK, 2012). Embora no presente estudo apresente uma outra abordagem, nas FIGs 4.34 e 4.35 foi visto por meio das linhas de corrente, que, com o cateter obstruído a pressão apresentava-se maior sob as células sanguíneas nos orifícios venosos 3 e no orifício central da ponta do cateter.

Como esperado, nos orifícios arteriais, os valores de pressão decrescem no decorrer da extensão do cateter, sendo o menor valor no orifício arterial 4 e o maior valor no orifício arterial 1. No orifício arterial 4 a mediana diminuiu de 10,32% quando o cateter foi obstruído e diminuiu em 22,39% no orifício arterial 1 em regime laminar.

A diferença de queda de pressão deve-se ao comprimento do cateter e localização dos orifícios. O orifício arterial 4 apresentou uma queda de pressão maior na aspiração de fluidos, uma vez que, apresenta uma maior resistência em aspirá-lo, ao passo que com a obstrução, a pressão caiu ainda mais, apresentando mais negativa para superar o aumento de resistência. Neste contexto, a pressão combinada com a tensão de cisalhamento são forças hidrodinâmicas complementares na conformação e disposição da fibrina no interior dos orifícios venosos.

Vale à pena ressaltar que, uma limitação deste estudo é que as imagens de MEV e de microsocopia de varredura a laser de dois fótons foram feitas somente com o orifício venoso do CVC. Portanto, é desconhecida a diferença entre a conformação da fibrina e influência dos parâmetros hemodinâmicos como a tensão de cisalhamento, velocidade e pressão no que diz respeito aos orifícios venosos e arteriais.

Vale à pena comentar ainda que, novas pesquisas, deveriam focar em estratégias de prevenção mais adequadas para o diagnóstico e tratamento da oclusão do cateter e da trombose relacionada ao CVC e, no desenvolvimento de novos agentes trombolíticos na prática clínica. O estudo da micro-estrutura e conformação da fibrina podem ser utilizados para verificar a eficácia da solução de *lock-terapia*, desenho do cateter, hemocompatibilidade do CVC e efetividade do tratamento para restaurar o fluxo sanguíneo em orifícios trombosados. Muitas perguntas e questões sobre a efetividade da solução *lock-terapia* para pacientes com trombos relacionados a cateteres ainda estão em aberto (SHERERTZ,

et al., 2006; MORAN *et al.*, 2008). A influência da solução *lock-terapia* na quantidade e na estrutura da fibrina formada no interior do cateter poderia ser avaliada por meio da aplicação de técnicas relatadas neste estudo incluindo estudos prospectivos. Do mesmo modo, o densenho interno e externo dos orifícios do CVC é crucial para minimizar a formação de trombo. Este estudo pode ser útil no teste de novos protótipos de cateteres e em validar novos modelos de simulação numérica.

4.5) Análise micro-morfológica do trombo

A análise de MEV mostrou que a fibrina varia na forma de agregação e na sua conformação no interior do orifício venoso. A fibrina foi a estrutura mais abundante presente no trombo venoso. Todos os trombos mostraram a presença de fibrina e a quantificação total apresentou uma mediana de 69,8% (IQR: 49,6-83,6). Aqueles cateteres venosos com áreas livres de trombos visíveis (superfície do polímero ao redor do orifício do cateter venoso central) resultaram na presença de fibrina na investigação em MEV. A quantificação de diferentes características da fibrina no trombo mostrou predominância de placa de fibrina em 23/29 (79%) das amostras, e predominância de rede de fibrina em 6/29 (21%) das amostras. A mediana de 42,6% (IQR: 30,1 - 63,0) e de 16,3% (IQR: 7,1-26,0) encontrou-se para placa de fibrina e rede de fibrina respectivamente.

Diferentemente observaram-se fibras de fibrina dispersas em 15/29 (52%) das amostras, com uma mediana de 0,4% (0-3,1%). Plaquetas, glóbulos vermelhos e brancos foram encontrados em 29/29, 28/29 e 17/29 das amostras com mediana de 9,3% (3,5-15,5), 10,3% (2,8-38,6), 1,7% (0,0- 0,8%) respectivamente). Pequenas quantidades de outras estruturas morfológicas, diferentes daquelas definidas neste trabalho e compativeis com a forma de cristais de colesterol foram encontradas em 16/29 das amostras com uma mediana de 0,3% (0,0-0,8%). O GRA 4.15 apresenta os resultados resulatdos encontrado em MEV na análise das amostras.

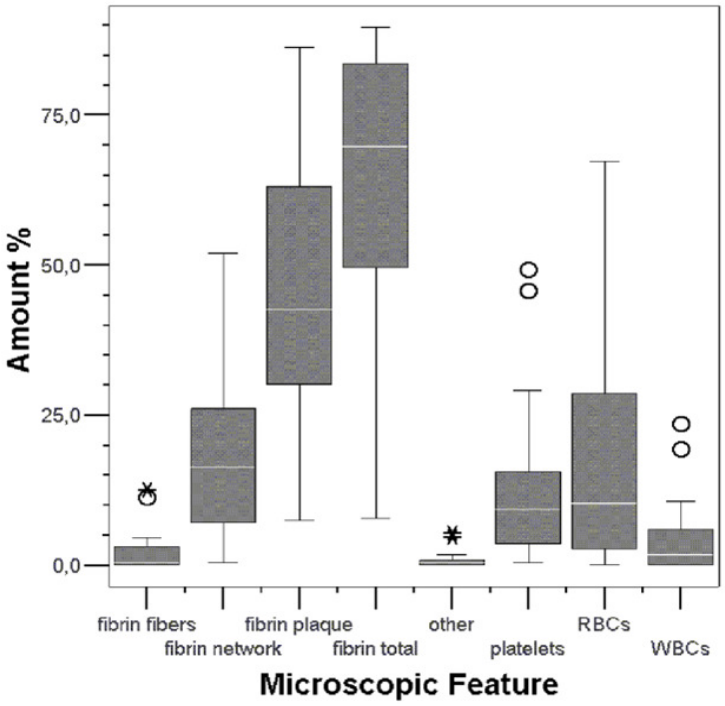


GRÁFICO 4.15: *Box plot* das características micromorfologicas dos trombos quantificados pela MEV. Total de fibrina acumulada: fibras de fibrina, rede de fibrina e placa de fibrina.

A FIG 4.47 apresenta as imagens da microscopia de varredura a laser de dois fótons das camadas superficiais e sub-superficiais (com uma profundida de até 24 μm) do trombo formado no interior dos orifícios laterais venosos dos cateteres.

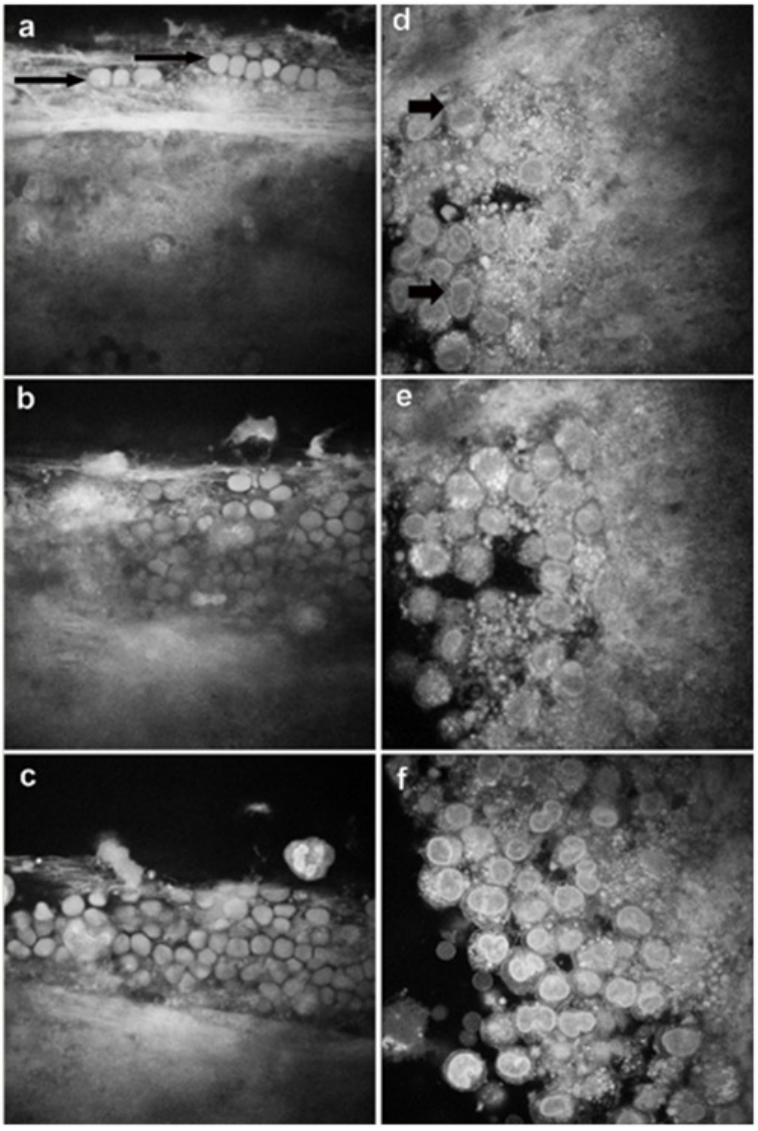


FIGURA 4.47: Diferença do tecido trombótico a partir da superfície (a, d) até as camadas sub-superficiais (b,c,e,f). Camadas superficiais são geralmente ricas em fibrina e camadas subjacentes contem mais glóbulos vermelhos. Camadas sub-superficiais foram coletadas 4µm (b), 8µm (c), 12µm (e), 24µm (f) abaixo da superfície do trombo. Colunas esquerda e direita apresentam áreas rica em glóbulos vermelhos (setas finas) e glóbulos brancos (setas espessas) respectivamente. Campo de visão: 120µm x 120µm.

As camadas superficiais apresentaram-se frequentemente cobertas por placas assimétricas de fibrina. Diferentemente, em camadas mais profundas do trombo observou-se uma pequena quantidade de fibrina e plaquetas e grande número de células sanguíneas vermelhas em comparação à composição das camadas superficiais observadas (FIGs 4.47(b) e (c)). A FIG 4.48 indica as micro-estruturas presentes na camada sub-superficiais do trombo.

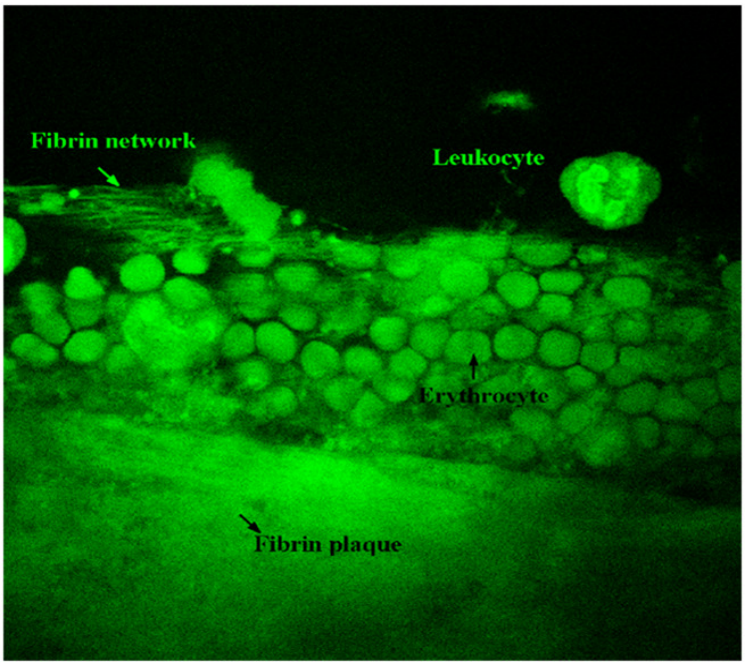


FIGURA 4.48: Microestruturas presentes na camada superfícial do trombo. Escala da barra: 50μm.

Informações da MEV são somente da superficie do trombo. Diferentemente, a microscopia de varredura a laser de dois fótons, revelou detalhes da estrutura subjacente à camada de tecido superficial. A FIG 4.47 mostrou que na superfície do trombo ha uma grande quantidade de fibrina, principalmente placa de fibrina. Diferentemente as camadas subjacentes mostraram a presença de

glóbulos brancos e vermelhos. Ambas as microscopias permitirem uma avaliação mais detalhada do tecido trombótico.

A FIG 4.49 apresenta a borda do orifício do cateter que correspondeu à borda do trombo, com a presença de uma camada espessa de placa de fibrina. À medida que se visualizava em direção ao centro do trombo segundo uma mesma profundidade, observa-se a prevalência de glóbulos vermelhos em relação à presença de fibrina.

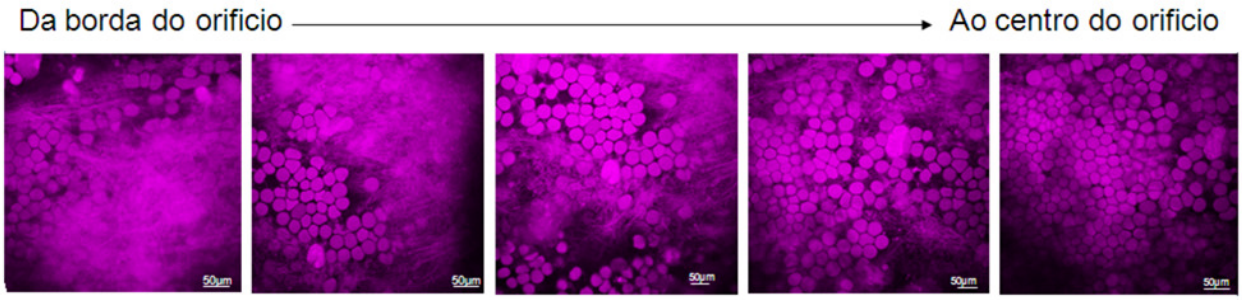


FIGURA 4.49: Superficie do trombo: borda do trombo coberta de placa de fibrina e centro coberto de eritrócitos.

A morfologia do trombo de dois cateteres venosos centrais removidos depois de 5 a 1080 dias de permanência é apresentada na FIG 4.50.

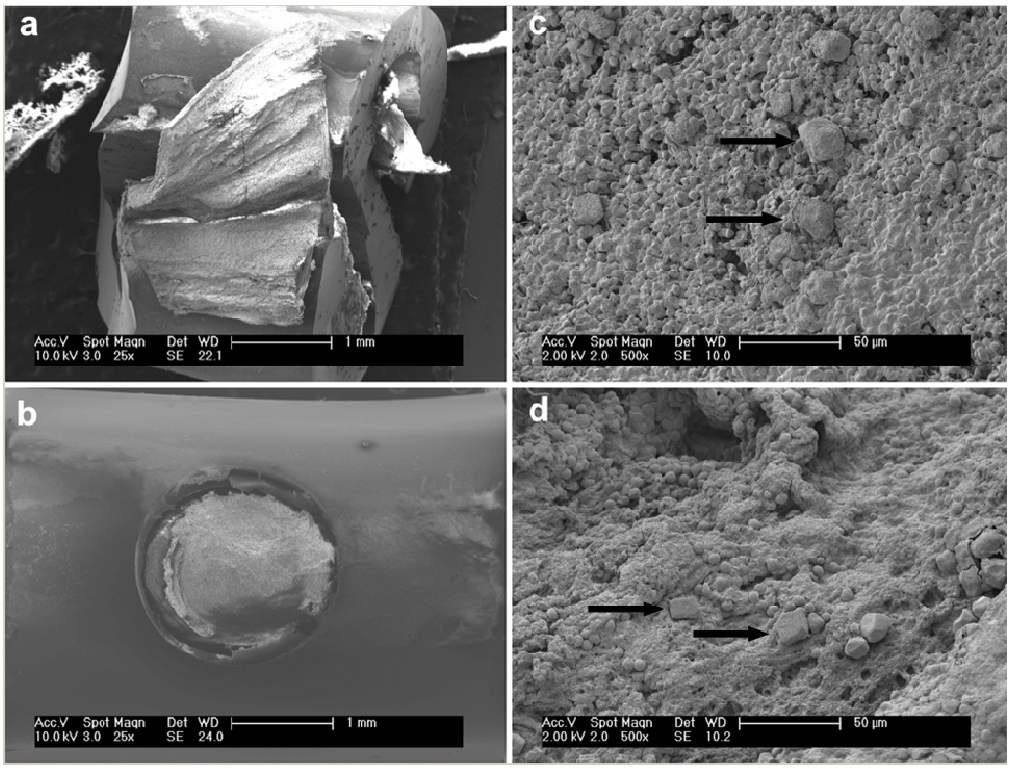


FIGURA 4.50: Imagens de MEV da morfologia do trombo em dois diferentes tempos de permanência: cateter CVC tunelizado com 1080 dias de permanência (a, c); não tunelizado com 5 dias de permanência na veia (b,d). As setas indicam cristais de colesterol. Magnificação original 25x (a, b), 500x (c,d).

As imagens dos CVC de longa permanencia mostraram células sanguíneas vermelhas cobertas por placas de fibrina (FIG 4.50(a) e (c)). Nesta amostra, a quantidade de fibrinas e globulos vermelhos foram de 49,6% e 22,9% respectivamente seguida por glóbulos brancos (3,3%), plaquetas (23,6%) e cristais de colesterol (0,5%). No que se refere às imagens dos cateteres não tunelizados, as FIGs. 4.50 (b) e (d) mostram as imagens do trombo no interior do cateter. Neste caso, 69,8% de fibrina total, 14,3% de células sanguineas vermelhas, 10,7% de glóbulos brancos, 4,9% de plaquetas e 1,8% de

cristais de colesterol foram encontrados. A área central do trombo corresponde ao centro do orifício, e as setas apontam para grande quantidade de glóbulos vermelhos e brancos cobertos de fibrina.

Independente do tempo de permanência os cateteres apresentaram grande quantidade placa de fibrina. A FIG 4.51 (a) apresenta um cateter de *12 dias* (70,2% placa de fibrina, 4,0 de rede de fibrina, 0,8% de plaquetas, 19% de glóbulos vermelhos e 6% de glóbulos brancos) e a FIG 4.51 (b) apresenta a imgem ampliada da placa de fibrina. A micrografia da FIG 4.51 (c) apresenta um cateter de *37 dias* (17,6% de placa de fibrina, 26% de rede de fibrina, 2,4% plaquetas, 48,0% de glodulos vermelhos e 6, 2% de glóbulos brancos) e a FIG 4.51 (d) mostra a imagem ampliada. A FIG 4.51 (e) apresenta um cateter com *182 dias* de permanência (30,1% de placa de fibrina, 19,2% de rede de fibrina, 1,6% de plaquetas,43,5% de glóbulos vermelhos e 5,3% de glóbulos brancos) e a FIG 4.51 (f) mostra a imagem ampliada.

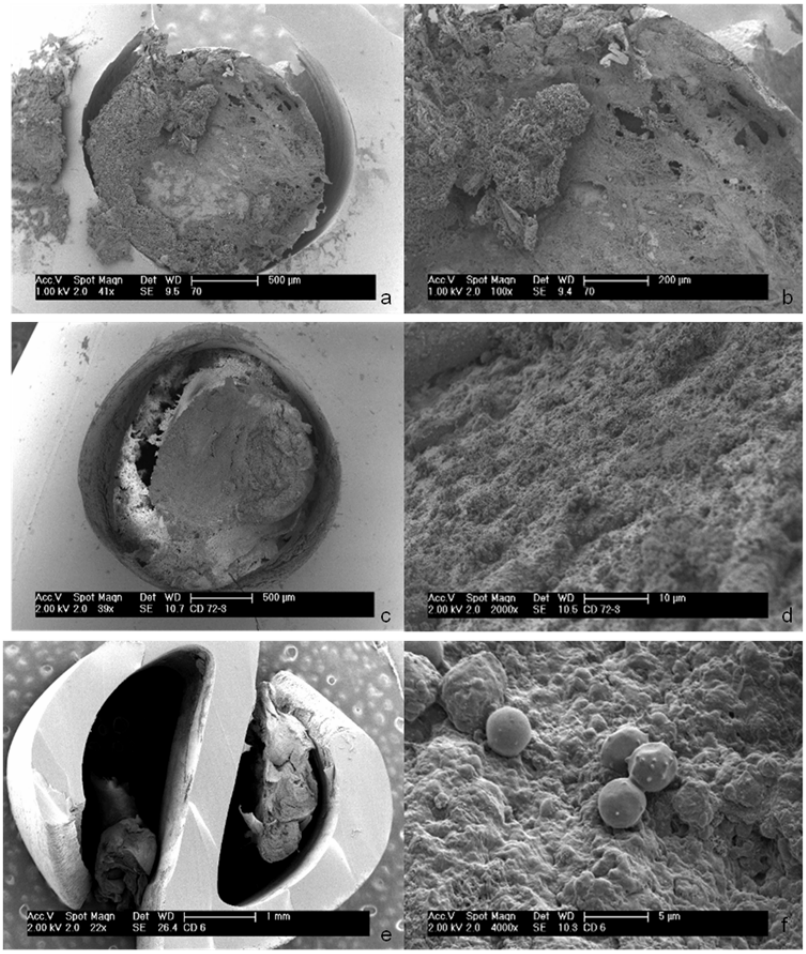


FIGURA 4.51: Cateter com 12 dias de permanência e a imagem ampliada da fibrina (a) e (b) respectivamente. Cateter com trombo no interior do orifício venoso com 37 dias de permanência (c) e a imagem ampliada da fibrina (d). Cateter tunelizado com 180 dias de permanência (e) e imagem ampliada da fibrina contendo glóbulos vermelhos e brancos (f). Magnificação original 100x e 500x.

A fibrina normalmente se desenvolve no contato entre a ponta do cateter e a parede do vaso dentro de 24 horas após a inserção do cateter, e, pode envolver todo o orifício do cateter venoso num período de cinco a sete dias (PARK *et al.*, 2008; SUGITA, 2009; BAID *et al.*, 2012). Encontrou-se neste estudo que, a quantidade de fibrina total foi o principal componente do trombo e que o restante de

sua composição na superfície era constituído principalmente por glóbulos vermelhos aprisionados em redes de fibrina. Estes resultados estiveram de acordo com o estudo de SILVAIN *et al.* (2011) realizado com trombo intra coronário obtido por tromboaspiração após infarto do miocárdio. A fibrina foi o principal componente do trombo maduro representando mais que 60% da composição do tecido após seis horas de obstrução do vaso.

Diferentemente, do estudo de MAZUR *et al.* (2013), avaliou em MEV o material trombótico *in vivo* do atrio, e encontrou qualitativamente que os eritrócitos representavam a principal composição e que as fibrinas encontravam-se randomicamente esparsas na superfície. Por outro lado, ao observar o trombo nas artérias pulmonares encontrou-se maior quantidade de fibrinas alinhadas e plaquetas e redução dos eritrócitos. Sendo assim, a estrutura do trombo, também pode estar relacionada com o tipo de vaso e com as condições do escoamento sanguineo naquele vaso.

A morfologia e a composição do trombo passam por modificações desde a fase inicial a matura até a completa obstrução do cateter (PRADO *et al.*, 2011; DONATI *et al.*, 2011; HAJBAGHERY *et al.*, 2012). A análise de MEV permitiu distinguir diferenças entre as estruturas da fibrina. As fibras de fibrina não foram encontradas em todos os cateteres e geralmente foi contabilizada em pouca porcentagem no trombo total. O trombo com as fibras de fibrina distribuída de forma esparsa desenvolve rapidamente para formar a rede de fibrina. As fibras se tornam densas e agregadas com plaquetas na fase inicial do trombo, favorecendo a ativação da coagulação e a formação contínua de rede de fibrina. O trombo resultante é composto de eritrócitos, plaquetas e células inflamatórias cobertas por rede de fibrina (RONCO *et al.*, 2004; SILVAIN *et al.*, 2011; WILLICOMBE *et al.*, 2012). Vale à pena mencionar que, durante o processo de coagulação, a trombina converte o

fibrinogênio a fibrina pela clivagem de fibrinopeptídeos e formação de uma estrutura denominada protofibril (DONATI *et al.*, 2011; BROOS *et al.*, 2011).

Quando o protofibril cresce e forma uma estrutura longa ele se agrega lateralmente para formar fibras de fibrina. Entretanto, algumas vezes ele diverge produzindo ramos separados de fibras (WEISEL, 2007; DONATI *et al.*, 2011). E, de acordo com as condições químicas e físicas a agregação lateral tende a produzir trombos feitos de fibras espessas com poucos ramos finos de fibras. Diferentemente se a agregação lateral é inibida, o trombo passa a conter finas fibras não densas e muitos ramos de fibras de fibrina. Este processo pode ser comparado ao presente estudo, em que a agregação lateral ocorre com o acúmulo de placa de fibrina na borda do cateter e rede de fibrina e fibras na região central do trombo.

A placa de fibrina representou a estrutura mais comum no trombo e era densamente estruturada mesmo com 5 dias de permanência do cateter. Isso confirma que o trombo completamente estruturado pode se desenvolver no orifício e no lúmen do cateter num período de tempo curto após a inserção do cateter. Um trombo que se forma no interior do orifício do cateter e continua crescendo, poderá alcançar uma completa obstrução, causar redução do fluxo e impedir o procedimento de hemodiálise (WEISEL, 2007; DONATI *et al.*, 2011).Vale a pena ressaltar que tanto os cateteres tunelizados, quanto não tunelizados a porcentagem de glóbulos vermelhos cobertos ou não por fibrinas prevaleceram em relação às plaquetas, como seguem os exemplos: a) *cateter tunelizado com 151 dias de permanência*: 49,0% de placa de fibrina, 27,2% de rede de fibrina, 4,5% , 6,6% de plaquetas e 10,3% de glóbulos vermelhos;b) *cateter tunelizado com 183 dias de permanência*: 30,1% placa de fibrina, 19,2% rede de fibrina,0,4% ,1,6% de plaquetas e 43,5% de glóbulos vermelhos; c) *cateter com 14 dias de permanência*: 57,3% de placa de fibrina, 6,2% de rede de fibrina, 0,4% de fibras de fibrina, 0,4% de

plaquetas e 28,6% de glóbulos vermelhos; d) *cateter com 9 dias de permanência*: 70, 2% de placa de fibrina, 13, 3% de rede de fibrina,4,0% de plaquetas e 12,4% de glóbulos vermelhos. A FIG 4.52 apresenta a imagem de cateteres tunelizados, com 151 dias e com 183 dias de permanência. Observa-se grande quantidade de glóbulos vermelhos recobertos de fibrina nas imagens ampliadas de cada um dos cateteres. Na imagem ampliada do CVC com 183 dias de permanência pode-se observar ainda a presença de dois glóbulos vemelhos e dois glóbulos brancos que não estavam cobertos por fibrina.

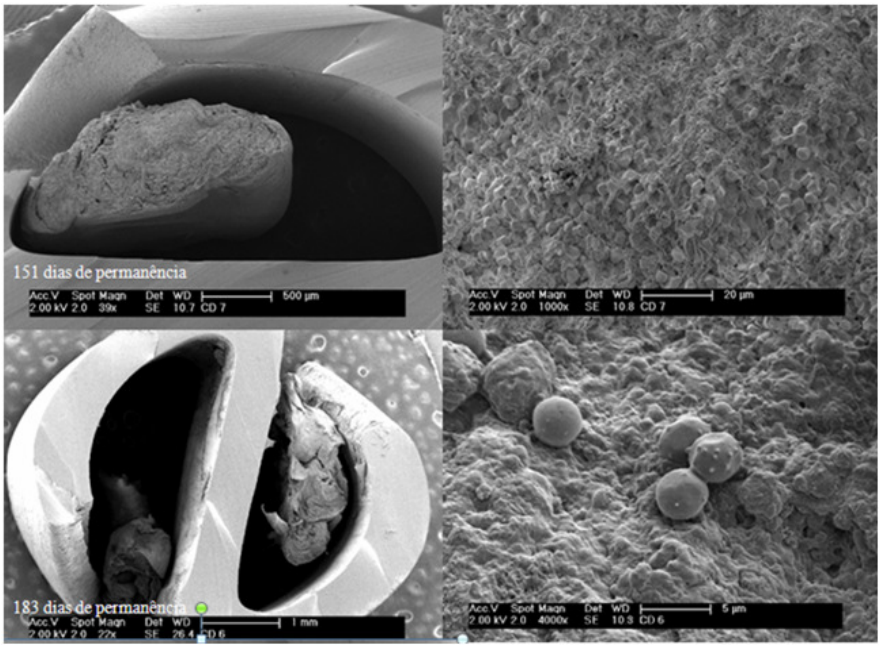


FIGURA 4.52: Cateteres venosos tunelizados com 151 e 183 dias de permanência. Imagem ampliada apresenta glóbulos vermelhos recobertos por fibrinas no cateter de 151 dias e no cateter de 183 dias. Observa-se a presença de glóbulos vermelhos e brancos que não estavam cobertos por fibrinas. Magnificação original 1000x, 4000x.

Esses exemplos podem confirmar a caracerística geral de um trombo venoso, geralmente composto principalmente de fibrinas e glóbulos vermelhos com variável quantidade de plaquetas e

glóbulos brancos. O trombo venoso é rico em fibrinas e cobertas por glóbulos vermelhos e são, portanto referidos como trombos vermelhos (LOWE, 2008; BAID *et al.*, 2012). Por outro lado, o trombo arterial possui alta concentração de plaquetas e baixa concentração de glóbulos vermelhos sendo referido como trombos brancos (LOWE, 2008; BAID *et al.*, 2012). Neste estudo, a mediana de eritrócitos foi maior que a mediana de plaquetas. No entanto, doenças de base, uso de anticoagulantes, tipo de cateter, posição de inserção e terapia medicamentosa poderiam influenciar na porcentagem de micro-estruturas. O trombo que forma no interior do orifício do cateter, pode causar redução do acesso ao escoamento, interromper o processo de hemodiálise e remoção do cateter (WEISEL, 2007; DONATI *et al.*, 2011).

O trombo que inicialmente se forma no interior do orifício do cateter pode crescer causar obstrução da veia, resultar em perda do órgão e com potencial risco de vida. Um estudo de prevalência realizado com pacientes de hemodiálise verificou que 37 dos pacientes avaliados, 23 (62%) desenvolveram trombose (FEDERICO, 2011). A literatura relata ainda uma incidência da síndrome pós-trombótica de até 80% dos casos (FEDERICO, 2011). As FIGs 4.53 e 4.54 compararam as imagens provenientes da MEV e a microspocia de varredura a laser de dois fótons. A FIG 4.53 apresenta a fibrina em verde (placa de fibrina mais espessa) e em azul (rede de fibrinas com variável numero de plaquetas ligadas) semelhante às imagens em MEV. Na FIG 4.54 as plaquetas entrelaçadas com a fibrina em vermelho, também se apresentaram semelhantes à conformação das plaquetas visualizadas na MEV. A imagem em lilaz da microscopia de varredura a laser de dois fótons apresenta a fibrina coberta, sobretudo, de glóbulos vermelhos e esparsos cristais de colesterol. Esta imagem também pode ser comparada à MEV.

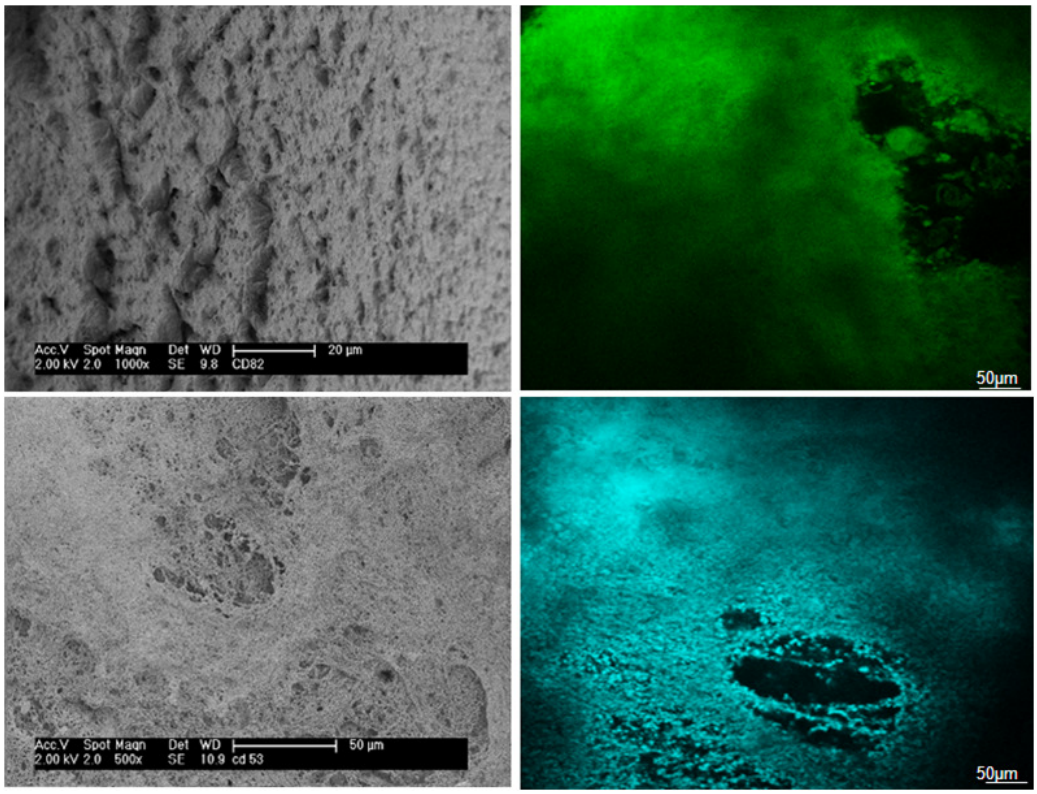


FIGURA 4.53: Comparação das micrografias da placa de fibrina e da rede de fibrina com as imagens da microscopia de varredura a laser de dois fótons. Placa de fibrina (verde), rede de fibrina (azul). Magnificação original 1000x.

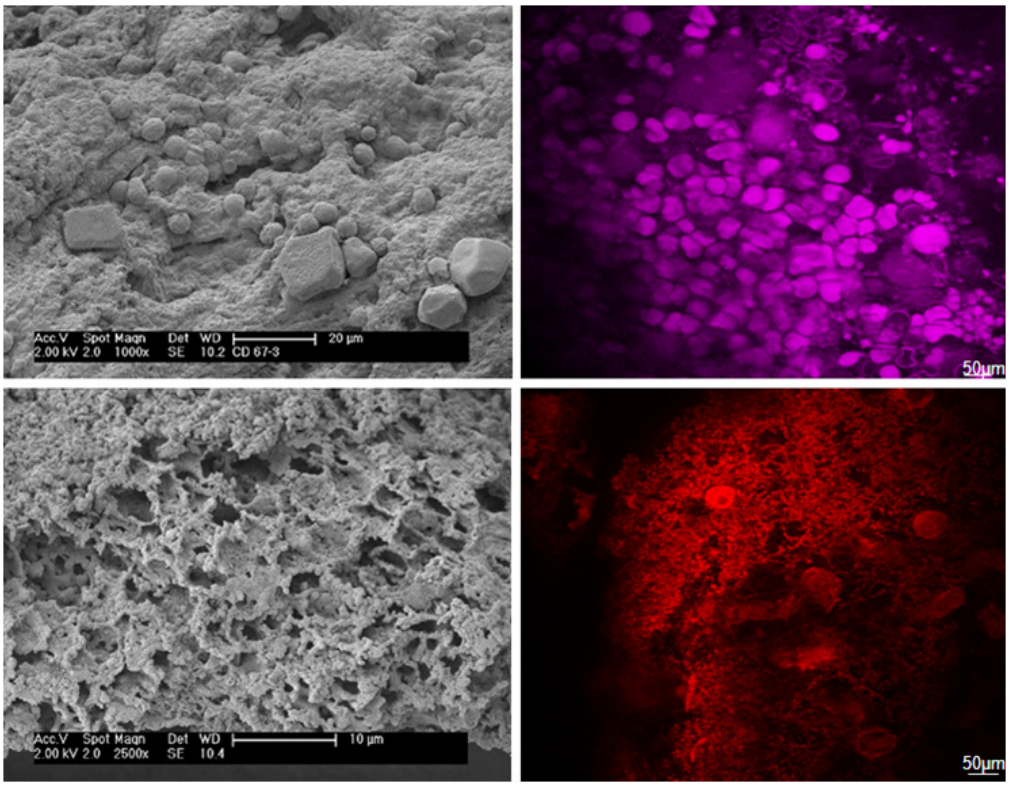


FIGURA 4.54: Comparação das micrografias da placa de fibrina coberta de glóbulos vermelhos e cristais de colesterol comparada à microscopia de varredura a laser de dois fótons (em lilaz). Rede de fibrinas e plaquetas em MEV comparada a microscopia de varredura a laser de dois fótons (vermelho). Magnificação original 1000x.

A aplicação da MEV e da microscopia de varredura a laser de dois fótons também foram úteis para evidenciar algumas considerações importantes a respeito da preparação da amostra. Embora a fixação preserve e integridade das membranas das células e da estrutura da fibrina, a desidratação e processo de secagem requerido pela MEV pode induzir a um significante encolhimento do trombo que alcança de 10 a 40% do volume total. As imagens de baixa magnificação foram, portanto, comparadas com a documentação fotográfica adquirida no estado hidratado para identificar corretamente a superfície do trombo original exposta a corrrente sanguinea no interior da veia. Comparando amostras pareadas da MEV com a microscopia de varredura a laser dois fótons, notou-se que as arquiteturas

microestrutural da fibrina e das células foram preservadas. Além disso, a razão percentual entre as micro-estruturas do trombo permaneceram praticamente inalterada depois do processo de desidratação. Uma possível alternativa para a convencional MEV seria a técnica de microscopia eletrônica de varredura ambiental

Essa técnica permite que a amostra permaneça hidratada sem a necessidade de remoção de água da amostra. Entretanto, a boa preservação das microestruturas da amostra deste estudo, e a ampla viabilidade da convencional MEV em relação à MEV ambiental, levou este estudo à utilização da MEV. Em resumo, a quantificação elucidada pela MEV mostrou que a fibrina foi o principal componente do trombo seguido por glóbulos vermelhos, plaquetas e glóbulos brancos.

Foi proposta uma nova classificação da estrutura da fibrina, diferenciada em placa de fibrina, rede e fibras de fibrina. Isso poderá ajudar a entender a formação do trombo no decorrer do tempo. Apesar do aumento do uso de cateteres venosos centrais, a falta de entendimento permanence no que se refere ao risco de desenvolvimento do trombo.

É importante destacar que, varios estudos têm avaliado a estrutura da fibrina e a composição do trombo em MEV e microscopia de varredura a laser de dois fótons (KOIOKE *et al.* 2011; KAMOCKA *et a.l* 2010; WHONER *et al.*, 2011; LONGSTAFF, 2011; MAZUR *et al.,* 2013). Estudos anteriores que avaliaram o desenvolvimento do trombo a partir de feridas com laser desenvolvidas em artérias de rato, em microscopia de varredura a laser de dois fótons, demonstraram grandes avanços nas pesquisas relacionadas à trombogenese (KOIOKE *et al.,* 2011; KAMOCKA *et al.*, 2010). Assim como neste estudo, KAMOCKA *et al.* (2010) por meio da avaliação do desenvolvimento do trombo em veias mesentéricas de rato, verificou que a fibrina era o maior componente do tecido trombótico.

Acrescenta-se a isso, o fato de que a fibrina torna-se uma estrutura estável no trombo depois de 6 minutos de monitoração do desenvolvimento do trombo nas vênulas de rato (KAMOCKA *et al.*, 2010). A superfície do trombo em crescimenteo era composta primariamente por plaquetas enquanto que o trombo estável continha alta porcentagem de fibrina (KAMOCKA *et al.,* 2010).

Neste estudo a microscopia de varredura a laser de dois fotons também poderá abrir novas perspectivas para a pesquisa em trombos venosos. A microscopia de varredura a laser de dois fótons permitiu entender a disposição da fibrina no interior do trombo em camadas mais profundas do orifício do cateter e a comparar com as estruturas micro-morfologicas que foram caracterizadas na MEV. Além disso, não existem estudos que classificaram a fibrina em três tipos: *placa de fibrina*, *rede de fibrina* e *fibras de fibrina* como foi feito neste estudo, permitindo um maior entendimento da confomação e da estrutura da fibrina no interior do trombo. Portanto, neste estudo, estabeleceram-se um novo modo de entender a estabilidade da fibrina, arquitetura e mecanismos de interação entre a fibrina, plaquetas, glóbulos vermelhos e brancos no interior do trombo.

Recentemente, estudos realizados *in vitro, in vivo* e com animais de laboratório, investigaram a composição do trombo e concluíram a rede de fibrina é dominante na composição do trombo e que consiste de fibras finas e espessa distribuída ao redor do tecido trombótico (LONGSTAFF *et al.*, 2011; UCHIDA *et al.,* 2011; LIEBSKIND *et al.*, 2011). Ressalta-se que, em acordo com esses estudos, a fibrina também apresentou neste estudo, a maior composição no interior do trombo. Outro estudo, analizou o trombo em artérias pulmonares e encontrou um menor número de glóbulos vermelhos quando comparados aos glóbulos brancos, acompanhados de densa quantidade de fibrina (MAZUR *et al.*, 2012). De acordo com esse estudo, a alta velocidade do fluxo sanguíneo nas artérias pulmonares contribuiu pelo menor número de glóbulos vermelhos quando comparados aos glóbulos brancos. Além

disso, o alto número de glóbulos brancos pode ter ocorrido devido a uma atividade recente de modulação ou degradação *in vivo* do trombo. Diferente desse estudo, os glóbulos vermelhos no interior do trombo venoso encontraram-se predominantes em todas as amostras quando comparados aos glóbulos brancos. Adicionado à isso, neste estudo, avaliou-se um trombo de característica venosa e não arterial. Finalmente, de acordo com pesquisas da literatura, este é o primeiro estudo a demonstrar a estrutura do trombo venoso *in vivo* no interior dos orifícios laterais dos cateteres CVC de um modo semiquantitativo.

Futuras pesquisas deveriam focar em estratégias de prevenção, diagnóstico e tratamento da oclusão do cateter. As técnicas reportadas neste trabalho têm mostrado excelente ferramenta de caracterização que pode ser utilizada efetivamente para novas estratégias que limitam a formação do trombo e que, sobretudo evitam complicações que podem levar a embolismo pulmonar, síndrome pós-trombótica e persistente comprometimento do vaso.

4.6) Análise histológica do trombo

As FIGs 4.55(a), (d) e (g) apresentam a coloração de Carstairs (40x), destacando fibrina corada em vermelho e os glóbulos vermelhos em amarelo. A porcentagem mais alta de fibrina foi encontrada na FIG 4.55 (a) (63%) seguida pela FIG 4.55 (d) (44%) e FIG 4.55 (g) (23%). A coloração em vermelho identifica as camadas de fibrina ao redor da parede do orificio do cateter e que circunda todo o trombo no decorrer de seu desenvolvimento e expansão.

O processo de adesão da fibrina à parede do cateter inicia minutos depois da inserção do CVC, uma vez que a superfície polimérica propicia a adesão e ativação das plaquetas por meio da via intrínseca de coagulação (CHEN, 2008; BAMBAUER *et al.*, 2012). Este processo pode ser considerado uma explicação para a inicial composição do trombo o qual a fibrina circunda a parede do orifício do cateter e adere firmimente à parede por meio de ligações poliméricas. É conhecido que, os

biomateriais quando em contato com a corrente sanguínea pode iniciar e acelerar a coagulação sanguinea (CHEN, 2008; XU *et al.*, 2009; BAMBAUER *et al.*, 2012).

Além disso, a superfície polimérica é adsorvida por proteínas, como a albumina, fibrinogênio e o vWF e íons presentes no plasma (cálcio) (CHEN, 2008; XU *et al.*, 2009; LONGSTAFF, 2009). Essas proteínas quando adsorvidas mudam a sua conformação e expõem à corrente sanguínea algumas sequências de peptídios funcionais no processo de interação com a superfície polimérica (CHEN, 2008; BROOS, 2011; COSEMANS *et al.*, 2011). Esses peptídeos funcionais possibilitam as ligações do fibrinogênio, por exemplo, com os receptores de plaquetas, e levam a sua agregação bem como a ligação cruzada com leucócitos e glóbulos vermelhos que se aderem à fibrina de modo irreversível. A quantidade de proteinas adsorvidas e seu estado conformacional são determinados pelas propriedades do material (JACKSOM, 2007; SWAMINATHAN, 2010).

Os polímeros influenciam na resposta biológica à superfície, incluindo adsorção de proteínas e atividade do fibrinogênio adsorvido. Vale a pena resslatar que, a interação entre as proteínas e o polímero, vai depender do tipo de material, dos grupos funcionais e dos domínios hidrofílicos e hidrofóbicos com apropriados tamanhos que correspondam à superficie das proteínas. Sabe-se que, superficie hidrofóbicas, como a maior parte dos polimeros, mantêm ligações fortes com as proteinas adsorvidas (CHEN, 2008; BROOS *et al*., 2011; COSEMANS *et al.*, 2011).

A exposição das sequências funcionais das proteínas possibilita maior interação com os receptores de plaquetas o qual leva à adesão, ativação e agregação de plaquetas. As plaquetas interagem com o fibrinogênio adsorvido através de receptores de adesão como o receptor integrina presente na membrana das plaquetas (THEVENOT; TANG, 2008; RUMBAUT; THIAGARAJAN, 2010). Assim, o biomaterial estimula a fibrinogênese e causa a construção de inúmeras cadeias de fibrina que podem resultar numa capsula fibrosa ao redor do material. Interessante comentar que, estudos têm demonstrado que, o fibrinogênio adsorvido apresenta significantes mudanças conformacionais com o aumento do tempo de permanência do material no sangue (CHEN, 2008, WU *et al.*, 2008; COSEMANS *et al.*, 2011).

O fibrinogênio é adsorvido após um minuto da inserção dos materiais e pode permanecer até duas horas antes de iniciar a sua atividade biológica (CHEN, 2008; WU *et al.*, 2008; COSEMANS *et al.*, 2011) . Assim, mudanças na reatividade conformação do fibrinogênio são os primeiros eventos que

ocorrem devido à interação do material com o sangue e, com a adsorção do contato das proteínas, resulta na ativação da cascata de coagulação. Nota-se que, no centro do trombo há predominância de glóbulos vermelhos como mostra a FIG 4.55 (h). Tal falto pode ser explicado pela convecção axial do escoamento sanguineo e a alta tensão de deformação nos orifícios laterais, que induz a difusão lateral de plaquetas e o fluxo central de glóbulos vermelhos.

A fibra de fibrina inicialmente estava alinhada de forma paralela à tangente do orifício do cateter, e, com o crescimento do trombo as camadas de fibrina infiltram e circundam o tecido fibroso de forma assimetrica. A deposição de concêntricas camdas de fibrina aumenta com o desenvolvimento do trombo, como pode ser visto nas FIGs 4.55 (e) e (b). Além disso, a direção circunferencial da fibra demonstra a influencia do substrato polimérico para o alinhamento da fibrina.

A maior área fluorescente vista na microscopia foi associada com fibrina (vermelho) pelo método de carstairs. De acordo com a coloração de carstairs os glóbulos vermelhos estão em amarelo (FIGs 4.55 (a), (d) e (g). Essas regiões foram associadas com a menor área fluorescente como mostrada nas FIGs. 4.55 (h), (e) e (b). As FIGs 4.55 (c), (f) e (i) mostraram a coloração em H&E.

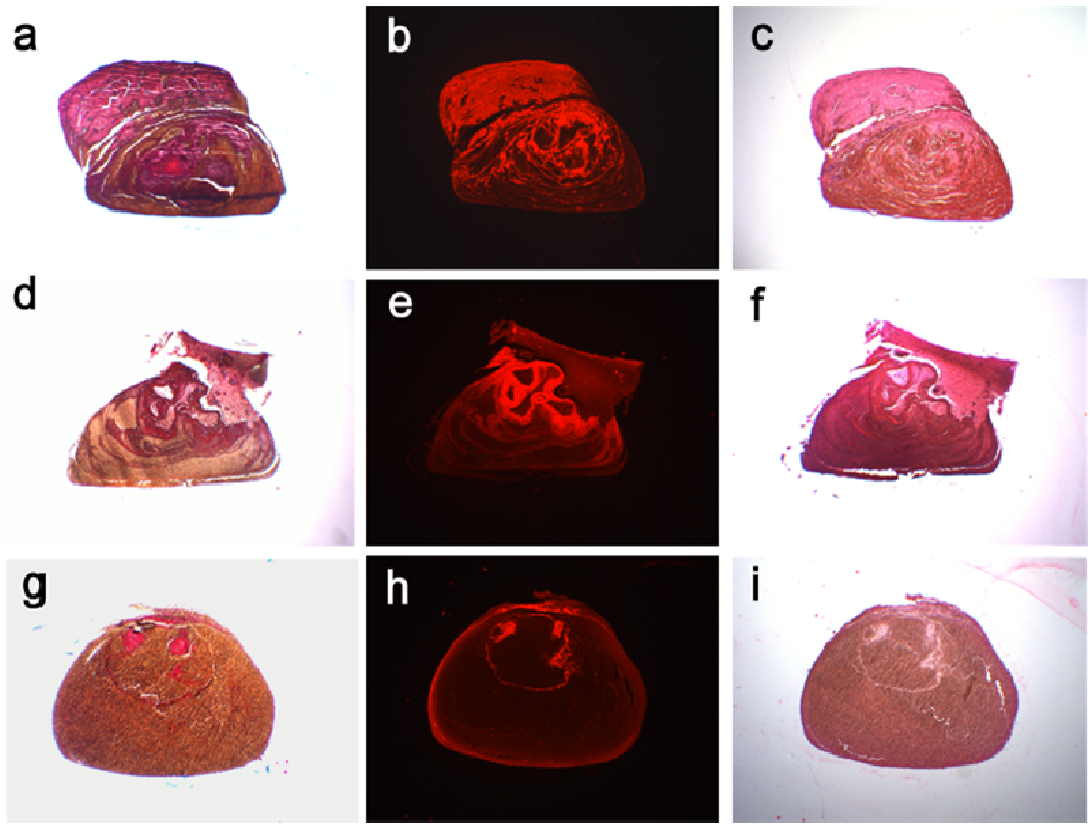


FIGURA 4.55: Método de Carstairs (a,d,g) plaquetas (azul marinho acizentado), fibrina (vermelho) e glóbulos vermelhos (amarelo). Microscopia de fluorescência (b,e,h area altamente fluorescente e area de baixa fluorescência). Coloração H&E (c,f,i). Magnificação original 40x. Escala da barra: 50µm.

A coloração de Carstairs foi essencial para validar a área fluorescente que circunda o trombo. A FIG 4.56 apresenta a comparação entre a coloração de Carstairs e a área de alta fluorescência indicando a presença de fibrina nas regiões coloridas em vermelho e áreas de baixa fluorecência indicando a presença de glóbulos vermelhos nas regiões em amarelo. Observa-se também a presença de plaquetas em azul marinho.

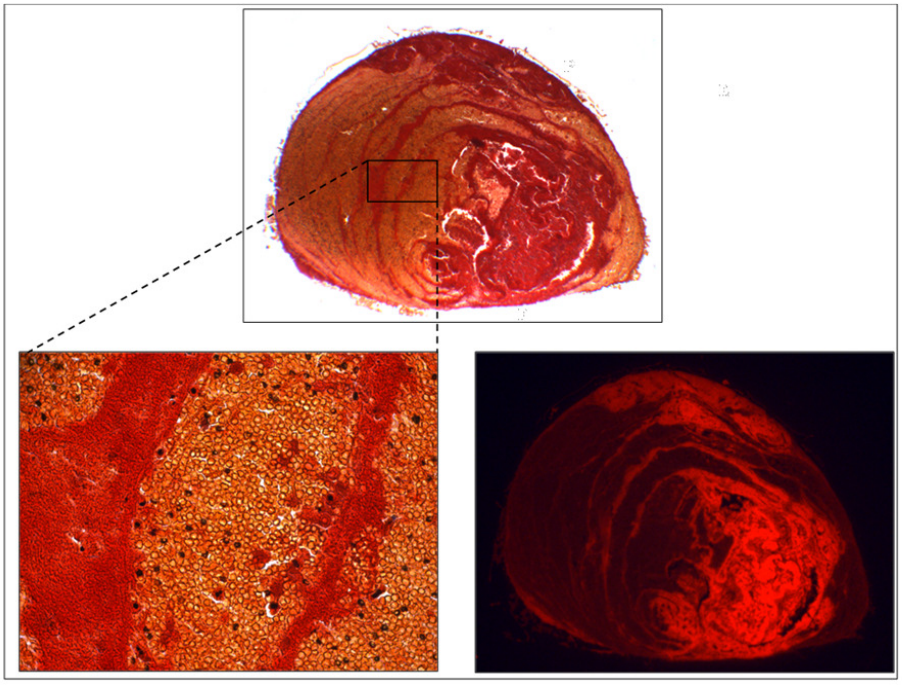


FIGURA 4.56: Coloraçao de Carstairs: plaquetas (azul marinho acizentado), fibrina (vermelho) e glóbulos vermelhos (amarelo). Magnificação original 40x e 100x. Escala da barra: 50µm.

Na FIG 4.57 a letra (F) indica a presença de fibrina e (GV) de glóbulos vermelhos. As setas indicam a presença de plaquetas em azul marinho, aderidas à fibra de fibrina.

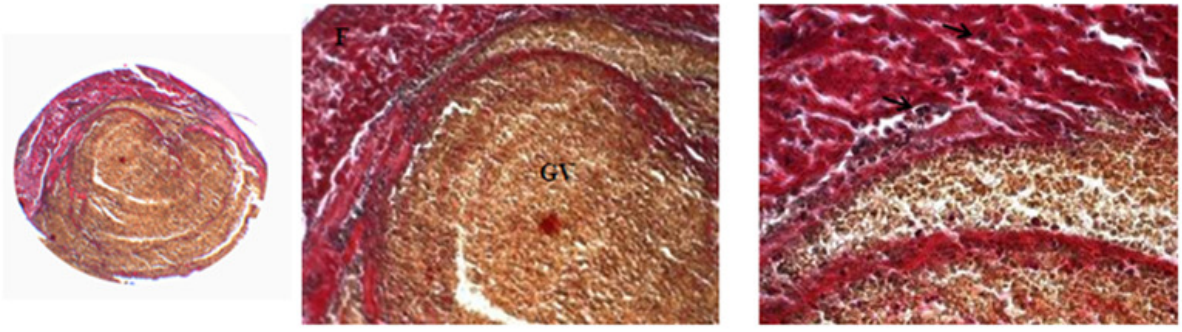


FIGURA 4.57: Coloraçao de Carstairs: plaquetas (azul marinho acizentado), fibrina (vermelho) e glóbulos vermelhos (amarelo). (F) fibrina e (GV) de glóbulos vermelhos. As setas indicam a presença de plaquetas em azul marinho, aderidas à fibra de fibrina. Magnificação original 40x, 100x e 200x. Escala da barra: 50µm.

Como o trombo venoso é predominantemente rico em fibrinas e em células vermelhas, a quantificação da área coberta por fibrina pela microscopia de fluorescência foi importante para validar a área de fluorescência considerada alta e baixa no interior do trombo. A combinação do método de Carstairs e da microscopia de fluorescência possibilitou a definição de um método de quantificação da fibrina dentro do conteúdo celular do tecido trombótico.

Comparou-se a porcentagem da área coberta por fibrina com os dias de permanência do CVC: no *grupo 1* a média percentual de fibrina foi de 58,0% (DP ±20); do *grupo 2* a média foi de 39,0% (DP±13) e para o grupo 3 a média foi de 43,0% (DP±13). Embora tenha sido observado que os trombos maduros contem grande quantidade de fibrina, neste trabalho, foi visto que além de grande quantidade de fibrina que encapsula todo o trombo, ele tende a ser mais estável em termos de diferenças de desvio padrão presentes no grupo 2 e 3, isto é, num tempo maior que 16 dias de permanência.

Por outro lado, no que diz respeito à variabilidade do desvio padrão, deve-se levar em conta o tamanho do trombo, a conformação no interior dos orifícios laterais e a disposição do trombo no interior do tecido. Além disso, a hemodinâmica do escoamento venoso, a recirculação e condições fisiológicas de cada paciente também contribuem para a variabilidade do desvio padrão. Vale a pena destacar ainda, as proteínas e fatores das vias de coagulação também contribuem para a diferença entre a porcentagem da área de fibrina e o tempo de permanência do CVC.

Destacam-se nesse caso, a atividade aumentada da trombina elevada níveis de fibrinogênio e aumentada contagem de plaquetas (BERNY, 2010). Sabe-se ainda que, a atividade aumentada de trombina nas superfícies das plaquetas pode ser atribuída à arquitetura da rede de fibrina (RUMBAUT; THIAGARAJAN, 2010; NEEVES *et al.*, 2010; PRETORIUS, 2011).

A concentração de trombina é um dos fatores mais importantes que dizem respeito à arquitetura da fibrina (WHITTAKER; PRZYKLENK, 2009; RUMBAUT; THIAGARAJAN, 2010). Sendo assim a sua concentração pode modificar toda a estrutura do trombo. Essa estrutura depende do processo de ligação cruzada formado entre as fibras, que variam de diâmetro e espessura e que se unem com padrões de bandas alinhados e ramificados (WHITTAKER; PRZYKLENK, 2009; RUMBAUT; THIAGARAJAN, 2010; NEEVES *et al.*, 2010; PRETORIUS, 2011). A fibrina proporciona resistência e estabilidade ao trombo.

Neste trabalho, o método descrito para o cálculo porcentual da área de fibrina aumenta o entendimento a respeito da estabilidade do tecido trombótico. Além disso, as técnicas descritas neste trabalho são uteis para a avaliação da morfologia e estrutura do trombo venoso. Particularmente, o trombo venoso intraluminal representa a maior complicação associada aos CVC e pode levar a sua má funcionalidade, trombose, embolia pulmonar e a perda do acesso (CARRILLO *et al.*, 2010; PRETORIUS, 2011). O GRA 4.16 mostra a mediana da área correlacionada à fibrina em pacientes do grupo 1, 56,0% (IQR: 43.0-72.0%); grupo 2, a mediana foi de 42,0% (IQR: 38.0- 46.0%.) e no grupo 3 a mediana foi de 45,5% (IQR:42-51%).

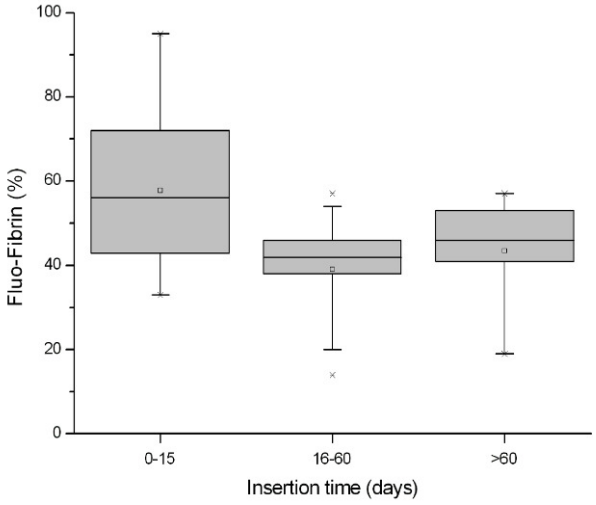


GRÁFICO 4.16: *Box plot* da porcentagem de fibrina fluorescente versus o tempo de permanência do CVC.

O gráfico *box plot* representa os valores minimos e maximos. Para cada valor a linha horizontal representa a mediana. Interessante notar que, o *box plot* permitiu a visualização da tendência do grupo 2 e 3 em exibir a porcentagem da área de fibrina mais estável no decorrer do tempo quando comparada ao grupo 1. Isso pode indicar que na formação inicial do trombo existe uma grande variabilidade da porcentagem de fibrina e que com o tempo se torna mais estável. Por outro lado, a formação inicial da morfologia da fibrina modifica com o tempo e a estrutura torna menos organizada e alinhada (CARRILLO *et al.*, 2010).

Na FIG 4.55 o trombo mais desenvolvido apresenta uma rede de fibrinas que circunda o trombo contendo fibras finas e espessas dispersas ao redor do tecido. No trombo mais jovem (FIGs 4.55(g), (h) e (i)) a rede de fibrina é composta de finas mais finas do que finas mais espessas e, não apresenta grandes aglomerados de fibras circundando o trombo. Esta diferença na disposição das fibras mais maduras e mais jovens também contribui para a maior variabilidade de fibrinas nos cateteres que continham de 0-15 dias de permanência.

Estudos prévios utilizaram a microscopia de fluorescência intravital e a análise histológica em H&E para a avaliação de trombos (ZHANG *et al.*, 2012; HARA *et al.*, 2012). Um destes estudos avaliou a disposição de fibrina *in vitro* num trombo venoso (HARA *et al.*, 2012). Consistente com esses resultados, neste estudo, a imagem da fibrina na microscopia de fluorescência também demonstrou um alto sinal de fluorescência no interior do trombo. A coloração de H&E em secções histológicas mostrou que o trombo era rico de fibrina em todas as amostras quando se comparou às analises que apresentaram um alto sinal na microscopia de fluorescência (HARA *et al.*, 2012).

Um fato interessante é que a estrutura de fibrina revelou pela microscopia de luz polarizada, ser formada por grupos de fibras ou feixes de fibras análogas a estrutura do colágeno (WHITTAKER; PRZYKLENK, 2009). Portanto, a fibrina apresenta uma estrutura molecular anisotrópica, o qual possibilita a visualização tanto na microscopia de luz polarizada quanto na microscopia de fluorescência (WHITTAKER; PRZYKLENK, 2009; YUMING *et al.*, 2011). A fibrina possui um alinhamento da fibra de característica não linear na relação tensão-deformação, alcançado por meio de tensões heterogenias na rede de fibrina (ADHIKARI *et al.*, 2011). Sendo assim, a fibra resiste de maneira diversa a cargas aplicadas em diferentes direções. Estudo recente avaliou o trombo venoso em modelo de rato com trombose venosa profunda por meio da coloração de carstairs (VON BRÜHL *et al.*, 2012). A coloração revelou extensiva deposição de fibrina intraluminal quando comparada a outras estruturas.

Embora a abordagem deste estudo seja diferente, o achado obtido no que diz respeito à disposição da fibrina no interior do tecido trombótico, apresentou-se consistente com este estudo. A coloração de Carstairs revelou camadas de fibrina que circundava o trombo e que se ramificavam internamente ao tecido, colorido de vermelho, plaquetas em azul marinho e glóbulos vermelhos em amarelo (VON BRÜHL *et al.*, 2012).

Além disso, o estudo demonstrou que, no trombo venoso as plaquetas são recrutadas como células individuais ligadas na rede de fibrina e que formam somente muito poucos agregados (GU *et al.*, 2010; ALFONSO; VIRMANI, 2011). Neste estudo, a disposição das plaquetas também se encontrou dessa forma como visto na coloração de carstairs. As plaquetas apareceram aderentes as cadeias de fibras e formaram pequenos agregados como visto na FIG 3.16 que mostrou uma grande quantidade de fibrinas densas em vermelho que circundava os glóbulos vermelhos em amarelo.

As plaquetas estão ligadas na rede de fibrinas e seguem direções diversas no interior do tecido. Estudo prévio realizado com microscopia de fluorescência e com a coloração de Carstairs analisou o trombo formado na veia jugular de ratos (HECHLER; GACHET, 2011). O estudo demonstrou que, o trombo era constituído de glóbulos vermelhos que se localizavam na região central do trombo e por plaquetas localizadas, sobretudo na periferia do tecido. Neste estudo, os exames histológicos também evidenciaram os glóbulos vermelhos localizados preferencialmente na região central do trombo bem como fibrinas ligadas a plaquetas acumuladas na região periférica do trombo.

Esta disposição pode ser vista claramente nas FIGs 4.56. e 4.57. Finalmente, quando o trombo já estava desenvolvido, a fibrina infiltrava no tecido e apresentava uma capa de tecido fibroso na superfície (CARRILLO *et al.*, 2010; HECHLER; GACHET, 2011). Mesmo se estudos sobre a fibrina e a composição do trombo têm sido reportados, o método quantitativo da área fluorescente do trombo abordado neste trabalho, até aonde se conhece, não foi ainda utilizado para avaliar a estrutura do trombo em nenhum outro estudo.

Um estudo *in vitro* analisou em ressonância magnética a diferença de intensidade de sinal entre trombos brancos e vermelhos (XING-YUE, 2012). O trombo branco apresentou hiperintensidade de sinal, uma vez que é formado principalmente por fibrinas e plaquetas e somente poucas células sanguíneas vermelhas. Em acordo com este estudo, a metodologia de análise de fibrina inserida neste trabalho, também mostrou que a região de fibrina no trombo é aquela que apresentou uma área altamente fluorescente na mcroscopia de fluorescência.

Dessa forma, as evidências fornecidas no presente estudo mostram que a microscopia de fluorescência é um método potencial de avaliação da estrutura do trombo. Além disso, a coloração de Carstairs demonstrou validar o entendimento a respeito da arquitetura de fibrina no interior do tecido. Embora muitos fatores influenciassem na estrutura do trombo, é provável que a densidade das fibras e

orientação alcance a estabilidade com o tempo. Em adição a isso, a deposição concêntrica de camadas de fibrina aumenta com o desenvolvimento do trombo o qual cresce e infiltra no interior do tecido.

A baixa porcentagem da área coberta de fibrina foi comparada com a coloração de Carstairs e associada com glóbulos vermelhos. A alta porcentagem de fluorescência foi associada à fibrina. Portanto, a microscopia de fluorescência e a coloração de Carstairs podem ser métodos adicionais aos métodos atuais de avaliação estrutural e tissular do trombo.

No que se refereàs análises estatísticas, a TAB 4.11 apresenta as variáveis plaquetas, PT e PTT na remoção do cateter e o tempo de permanência do CVC comparado à percentagem de fibrina encontrada na microscopia de fluorescência e a fibrina total encontrada na MEV. No entanto, como alguns dados do formulário não estavam disponíveis para todos os pacientes, não foi possível descrever todas as variáveis nas análises estatísticas. Algumas análises descritivas podem ser vistas no ANEXO C.

TABELA 4.11

Distribuição das variáveis: tempo de permanência, plaquetas, PT e PTT obtidos na remoção do CVC comparados com a fibrina total analisada em MEV e em microscopia de fluorescência.

Tempo x Fluorescência (n=28)	**Plaqueta na remoção x Fluorescência (n=31)**	**Tempo x Fibrina Total (MEV) (n=26)**	**PTT Remoção x Fluorescência (n=31)**	**PT Remoção x Fluorescência (n=31)**	**Plaqueta na remoção. X Fibrina total (MEV) (n=29)**	**PT na remoção x Fibrinatotal (MEV) (n=29)**
Shapiro-Wilk: Tempo (p<0,0001) Fluorescência (p=0,1180)	**Shapiro-Wilk**: Plaqueta (p<0,0001) Fluorescência (p=0,1424)	**Shapiro-Wilk**: Tempo (p<0,0001) Fibrina total (p=0,034)	**Shapiro-Wilk:** Tempo (p<0,23) Fluorescência (p=0,14)	**Shapiro-Wilk:** PT (p=0,34) Fluorescência: (p=0,14)	**Shapiro-Wilk:** Plaquetas (p<0,0001) Fibrina total (p=0,012)	**Shapiro-Wilk:** Pt (p=0,27) Fibrina total: (p=0,013)
Mann- Whitney U: p=0,0016 **Correlação spearman**: (r=0,087) (p=0,27)	**Mann-Whitney U:** p<0,001 **Correlação spearman**: (r=0,086) (p=0,63)	**Mann-Whitney U**: p=0,001 **Correlação spearman**: (r=0,086) (p=0,75)	**Teste t não pareado**: p<0,0001/ R^2=0,75 **Correlação Pearson**: (r=-0,02) (p=0,91)	**Teste t não pareado**: p<0,0001/ R^2=0,75 **Correlação Pearson**: (r=-0,08) (p=0,65)	**Mann- Whitney U:** p<0,0001 **Correlação spearman**: (r=0,077) (p=0,69)	**Mann- Whitney U:** p<0,0001 **Correlação spearman:** (r=0,032) (p=0,87)
Mediana: Tempo: 19(4-1016) Fluorescência: 44,5(14-95)	**Mediana:** Plaquetas: 213(70-897) Fluorescência: 44(12-95)	**Mediana:** Tempo: 19 (4-1016) Fibrina total: 72 (7,8-89,6)	----------	----------	**Mediana:** Plaqueta: 213 (70-897) Fibrina total: 69 (7,8-89)	**Mediana:** PT: 1,06(0,83-1,25) Fibrina total: 69,8(7,8 -89,6)
Média±DP: Tempo: 79,9±195,8 Fluorescência: 46,04±17,12	**Média±DP**: Plaquetas: 246,2± 158, Fluorescência: 44,29±17,68	**Média±DP**: Tempo: 84,6±202,7 Fibrina total: 66,5±20,2	**Média±DP :** PTT: 0,99±1,13 Fluorescência: 44,29±17,68	**Média±DP :** PT: 1,061±0,11 Fluorescência: 44,29±17,68	**Média±DP:** Plaquetas: 248,2±163,4 Fibrinatotal: 66,09±19,8	**Média±DP:** PT: 1,06±0,12 Fibrina total: 66,09±19,81

*$p<0,05$

Os dados estatísticos mostraram que, as correlações de *Pearson* e de *Spearman* não foram significativas (p >0,05). No entanto, observou-se significância estatística nos testes de Mann-Whitney

U e no teste t não pareado (p <0,05) entre as variáveis tempo de permanência, PT, PTT e plaquetas na remoção do CVC quando comparados à percentagem de fibrina obtida na MEV e na microscopia de fluorescência. No entanto, devido ao pequeno número de amostra deste estudo piloto, não se fez inferência estatística das variáveis plaquetas, PT e PTT em relação à tendência à formação de trombos e desenvolvimento de fibrina. A TAB 4.12 mostra o tempo permanência do CVC não tunelizado comparado à fibrina obtida da microscopia de fluorescência. A seguir estratificou-se o tempo de permanência em grupos < 17 dias e ≥ 17 dias de inserção do CVC comparado com a percentagem de fibrina encontrada na microscopia de fluorescência.

TABELA 4.12

Valores do tempo de permanência do CVC não tunelizado comparado à fibrina total obtida pela microscopia de fluorescência. Estratificação do tempo em grupos < 17 dias e ≥ 17 dias de inserção do CVC.

Tempo CVC (silicone/não-tunelizado) x Fluorescência (n=22)	**Grupos <17 (n=11)**	**Grupos ≥ 17 (n=11)**
Shapiro-Wilk:	**Shapiro-Wilk:**	**Shapiro-Wilk:**
Tempo (p<0,0001)	Tempo (p=0,4)	Tempo (p<0,0001)
Fluorescência (p=0,08)	Fluorescência (p=0,9)	Fluorescência (p=0,0038)
Mann-Whitney U:	**Teste t não pareado:**	**Mann-Whitney U:**
p=0,001	(p< 0,0001)/R^2=0,69	p=0,056
Correlação spearman	**Correlação pearson**	**Correlação spearman**
(r=-0,22) (p=0,31)	(r=-0,05) (p=0,8)	(r=-0,018) (p=0,95)
Mediana:	----------	**Mediana:**
Tempo:16,5(4-316)		Tempo: 22(17-316)
Fluo: 44,5(14-95)		Fluo: 43(14-57)
Média±DP	**Média±DP**	**Média±DP**
Tempo: 32,3±64,5	Tempo: 11,45±3,51	Tempo: 52,54±88,31
Fluo: 48,2±17,7	Fluo: 54,27±20,2	Fluo: 41,73±10,40

*$p<0,05$

Observou-se uma correlação não significativa ($p > 0,05$). Ao analisar o teste de Mann-Whitney U observou-se significância estatística entre a fibrina encontrada na microscopia de fluorescência e o tempo de permanência do CVC ($p < 0,05$) sem a estratificação dos grupos. Ao analisar o tempo de permanência estratificado, observou-se significância estatística no teste t não pareado para o grupo <17 dias de permanência do CVC e, não se observou diferença estatística entre os grupos ≥17 dias de permanência do CVC e a fibrina fluorescente.

Vale à pena mencionar que, o presente trabalho buscou com o estudo piloto, a aplicação de novos métodos e técnicas experimentais avançadas para a análise do trombo venoso em CVCs que até então, não foram testados e aplicados em estudos anteriores.

5 CONCLUSÃO

Diante dos principais resultados encontrados neste trabalho, concluiu-se que o estudo numérico que diz respeito ao efeito do escoamento quando na presença do cateter, possibilitou entender, sobretudo, o aumento da tensão de cisalhamento e da pressão quando o CVC está inserido no interior de uma veia central. Além disso, independente do regime laminar ou turbulento o efeito do cateter no escoamento foi praticamente o mesmo, com diferenças máximas entre as variáveis hemodinâmicas de 6% entre os regimes. Além disso, mesmo com a ausência de escoamento no interior dos orifícios arteriais e venosos, a presença do cateter na veia gerou um distúrbio no escoamento. Tal distúrbio foi evidenciado com detalhes quando analisado a simulação dos CVCs na presença e na ausência de obstrução parcial. Regiões de recirculação, separação do escoamento e de vórtices foram visualizadas nos cateteres desobstruídos e obstruídos. Tais distúrbios contribuíram para a formação de fibras de fibrina contorcidas de padrão assimétrico e distribuída de forma heterogênea e randomizado observados na MEV e na microscopia de varredura a laser de dois fotons. Destaca-se ainda que, a presença de obstrução parcial no cateter gerou a formação de longos vórtices fixos no escoamento, o que aumenta o transporte de plaquetas para a parede do cateter e a deposição de fibrina no interior dos orifícios laterais.

Com o estudo numérico foi possível observar ainda que a placa de fibrina aderida à parede interna do orifício venoso forma-se numa região de alto distúrbio do escoamento. Diferente, dos orifícios venosos, na entrada dos orifícios arteriais, não foi encontrado áreas de recirculação e formação

vórtices, entretanto, observou-se pontos de estagnação na parede do cateter localizada entre os orifícios laterais.

Adiciona-se a isso, o aumento da tensão de cisalhamento e da taxa de deformação quando na presença de obstrução parcial no cateter, o que induz a um rápido processo de adsorção das camadas de fibrina na parede interna do orifício venoso.

No que diz respeito à análise semi-quantitativa da micro-morfologia do trombo venoso, observou-se uma maior composição de fibrinas, seguido de glóbulos vermelhos e com variável quantidade de plaquetas e glóbulos brancos. Para uma melhor análise da conformação e arquitetura da fibrina discriminou-se em *placa de fibrina*, *rede de fibrina* e *fibras de fibrina* no interior do trombo venoso encontrada no CVC. Tal diferenciação foi essencial para entender o processo de desenvolvimento e maturação da fibrina no interior dos orifícios laterais e a associação de sua conformação com a tensão de cisalhamento e taxa de deformação.

No estudo histológico e de microscopia de fluorescência, as secções do tecido trombótico, foram comparadas ao perfil de velocidade no estudo numérico. Observou-se uma maior concentração de glóbulos vermelhos no centro do orifício venoso e de plaquetas na parede interna do orifício. Tal disposição está asociada ao aumento da velocidade com a presença de obstrução parcial no CVC, em que os glóbulos vermelhos migram para o centro e translocam as plaquetas para a parede do orifício.

Observou-se que, independente do tempo de permanência do CVC os trombos analisados possuíam grande quantidade de fibrina em sua composição. Foram propostos novos métodos de análise experimental da fibrina. A estrutura da fibrina foi observada com coloração de Carstairs e comparada com aquela obtida na microscopia de fluorescência. Observou-se ainda que, a fibrina possui alta fluorescência e que pelo método de segmentação de imagens foi possível quantificá-la. Tal técnica

associado à MEV e a microscopia de varredura a laser de dois fótons, possibilitou vislumbrar a inserção de novos métodos de análise de trombo venoso de forma a buscar soluções efetivas que minimizam o seu desenvolvimento no interior do CVCs.

6 TRABALHOS FUTUROS

Trabalhos futuros poderiam pesquisar:

- Novas geometrias de orifícios lateriais e de cateteres de hemodiálise que limitam a formação de trombo. Diferentes desenhos e ângulos dos orifícios venosos e arteriais, levando em consideração as regiões de entrada e saída do fluxo sanguíneo no interior do CVC poderia contribuir para minimizar o desenvolvimento acelerado de trombos. Além disso, mecanismos de válvulas de abertura e fechamento no interior dos orifícios laterais, poderiam contribuir para a proteção do desenvolvimento do trombo no período em que o cateter não esta em uso de hemdodiálise. O cálculo de uma distância ótima entre os orifícios arteriais e venosos diminuiria a recirculação sanguínea.

- O estudo da hemocompatibilidade do material polimérico também contribui para uma menor adesão das proteínas sanguíneas e menor agregação plaquetária aos polímeros. Associado a isso, a construção de um material em que possibilite uma menor fricção na parede do vaso e menores lesões na camada intima da veia.

- Estratégias de prevenção e tratamento da oclusão do cateter por meio do desenvolvimento de novos agentes anticoagulantes, trombolíticos e fibrinolíticos que impeçam a formação de fibrina. O interessante seria que o tratamento impedisse que a fibrina formasse ligações covalentes com a parede do cateter e que não permanecesse aderida. Assim, a destruição do trombo seria completa e seria um modo de dificultar o desenvolvimento de um novo trombo no mesmo local.

ABSTRACT

LUCAS, T. C. **Thrombus formation in hemodialysis catheters:** assessment of the micromorfological structures and numerical study of the venous flow behaviour. 2013.233P. Thesis (PhD in Mechanical Engineering) - Engineering School,Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

Although the lateral holes of the central venous catheters allow good flow rate for hemodialysis, they can favor the flow disturbance providing a critical hemodynamic environment which stimulates the venous thrombi and fibrin development. Furthermore, altered hemodynamic conditions can influence in the fibrin structure and conformation into the lateral holes. The present work aimed at assessing the micromorfological structures which distinguish the venous thrombus in vivo and the venous flow behaviour in the presence of the central venous catheters. It was performed the computational fluid dynamics in laminar and turbulent regime for comparing the flow in the partially obstructed and unobstructed catheters. It was used the scanning electron microscopy, two-photon laser scanning microscopy, fluorescence microscopy and histological analysis for understanding the micromorfological features in the thrombi in vivo and for comparing the tissue arrangement with the hydrodynamic forces in the venous flow. It was observed that the lateral holes sustained a threshold of high shear stress during the cardiac cycle. The average of shear rate in the internal wall of the venous hole in the laminar flow increased from 8047.46 ±18.21s^{-1} to 12400.02±7.40s^{-1} when the catheter was obstructed and in the turbulent flow increased from 6449.06±18.31s^{-1} to 10497.04±4.62 s^{-1}. Although the values of shear rate have been found lower in the turbulent flow when compared with the laminar flow, the values have been considered elevated according to the physiological parameters. The median of the pressure in the tip hole of the laminar flow was of 1056 (649 – 2120) Pa for the unobstructed

catheters and of 2163 (1557–3231) Pa for the obstructed catheter. Higher jet exiting can elevate the mechanical load and stimulate the fibrin development. The fibrin conformation was related with the complex flow pattern: flow eddies, recirculation zones and flow separation associated with high shear stress and shear rate regions. The lateral venous holes showed a higher flow disturbance than the arterial holes. It was observed an association between the fibrin conformations assessed in the scanning electron microscopy and in the two-photon laser scanning microscopy and the wall shear stress and shear rate into the venous hole. With regards the quantification of fibrin amount by fluorescence microscopy, the highest fluorescent area was correlated to fibrin and the lowest fluorescent area was correlated to erythrocytes. Finally the techniques presented in this study showed appropriated for the trombi characterization and can be applied in development and testing of new strategies for limiting thrombus formation on vascular access by central venous catheters.

Keywords: Central venous catheters. Computational fluid dynamics. Electron microscopy. Two-photon laser scanning microscopy. Thrombus. Bioengineering

7 REFERÊNCIAS

ABURAHAMA, A.F., BANDYK, D.F. Noninvasive vascular diagnostics (13ed). London: **Springer**, 760pp. 2013.

ADHIKARI, S.A. et al. Strain tunes proteolytic degradation and diffusive transport in fibrin networks. **Biomacromol**,v.13, p.499-506, 2012.

ADIB-HAJBAGHERY, M. et al. Quality of care of vascular access in hemodialysis patients in a hemodialysis center in Iran. **J Vasc Nurs**, v.30, p.24-28,2012.

AI, L. *et al.* Optimization of intravascular shear stress assessment in vivo. **Journal of Biomechanics**, v.42, p.1429-1437, 2009.

ALFONSO, F; VIRMANI, R. New Morphological insights on coronary plaque rupture. **JACC Cardio Interv**, v.4, n.1, p.83-6,2011.

AKRAM, M., ABBAS, G. Double lumen catheters recirculation in patients undergoing hemodialysis. **Med J**, v.18, n.3, p. 470-474, 2011.

ABRAHAM, J.P., SPARROW, E.M. MINKOWYCZ, W.J. Internal-flow Nusselt numbers for the low-Reynolds-number end of the laminar-to-turbulent transition regime. Int J Heat Mass Transfer,v.54, p.584-588, 2011.

ASH, SR. Advances in Tunneled Central Venous Catheters for Dialysis: Design and Performance. **Semin Dial**, v.21, p. 504-15, 2008.

ASHRAFIZAADEH, M.; BAKHSHAEI, H. A comparison of non-Newtonian models for lattice Boltzmann blood flow simulations.**J Com Math**, v.58, n.5,p.1045-1054, 2009.

BAID, F.V. et al. Impact of altered venous hemodynamic conditions on the formation of platelet layers in thromboemboli. **Thromb Res**, v.129, p. 158-63, 2012.

BAJD, F. J. *et al*. Impact of altered venous hemodynamic conditions on the formation of platelet layers in thromboemboli. **Thromb Res***,* v.129, p.158-163, 2012.

BAMBAUER, R. *et al.* Surface-Treated versus Untreated Large-Bore Catheters as Vascular Access in Hemodialysis and Apheresis Treatments. **Int. J. Nephrol***,* v.2012, p.1-8, 2012.

BATEMAN, R.M. *et al*. S-Nitrosoglutathione acts as a small molecule modulator of human fibrin clot architecture. **PLoS One**, v.7, n.8, 2012.

BERNY, M.A. *et al*. Spatial distribution of factor Xa, thrombin, and fibrin(ogen) on thrombi at venous shear. **PLoS One**,v. 5, 2010.

BESABARD, A., PANDEY, R. Catheter management in hemodialysis patients: delivering adequate flow. **Clin J Am Soc Nephrol***,* v. 6, p. 227–234, 2011.

BLASKIN, J.L. Management of occlusion and thrombosis associated with long-term indwelling central venous catheters. **Lancet**, v.364,p.1-23, 2009.

BOGNER,A. *et al*. A history of scanning electron microscopy developments: towards''wet-STEM'' imaging. **Micron**, v.38, p.390-401, 2007.

BROOS, K.H.B. *et al*. Platelets at work in primary hemostasis. **Blood Rev**,v.25, p.155-167, 2011.

BRUNETTE, R. *et al*. 3D flow study in a mildly stenotic coronary artery phantom using a whole volume PIV method. **Med Eng Phys**, v.30, p.1193-1200, 2008.

CALDINI, C.Visualizzazione di lesioni cutanee in microscopia ottica confocale e a due fotoni.2009.135f. Tesi di Laurea specialistica. **Facoltà di Scienze Matematiche Fisiche e Naturali**, Universidade de Trento,Trento, Italia, 2009.

CAMPBELL, R.A. *et al*.Flow profoundly influences fibrin network structure: Implications for fibrin formation and clot stability in haemostasis. **Thromb Haem**,v.106, n.6,p.1281-1283, 2010.

CARRILLO, L.R.et al. Anti-CD40L Immune complexes potently activate platelets in vitro and cause thrombosis in FCGR2A transgenic mice. **J Immunol**, v.185, n.28, p.1577-1583, 2010.

CARSTAIRS KC. The identification of platelet antigens in histological sections. **J Path bact**, v.90, n.1965, p.225-231.

CHANG, X. Shear efect on material induced blood cell activation. **Thesis presented to the University of Waterloo**. Waterloo, Ontario, Canada, 2011.

CHEN, H *et al*. Biocompatible polymer materials: role of protein–surface interactions. P**rog Polym Sci,** v.33, p.1059-1087, 2008.

CHIEN, S. Effects of disturbed flow on endothelial cells. **Ann Biomed Eng**, v.36, p.554–62, 2008.

CHIU, J.J., CHIEN, S. Effects of disturbed flow on vascular endothelium: pathophysiological basis and clinical perspectives. **Physiol Rev**, v. 91, p.327–387, 2011.

CHUNG, C.P., Hu, H.H. Jugular venous reflux. **J Med Ultrasound**, v.16, p. 210-222, 2008.

COSEMANS, J.M.E.M. et al. Key role of glycoprotein Ib/V/IX and von Willebrand factor in platelet activation-dependent fibrin formation at low shear flow. **Thromb Haemost**, v.117, p.651-660,2011.

DONATI, G. et al. Thrombosis of tunneled-cuffed hemodialysis catheters: treatment high-dose urokinase lock therapy. **Artif Organs**, v.36, p. 21-8, 2011.

DWYER A. Surface-treated catheters- a review. **Semin Dial**, v.21, p. 542-6, 2008.

FAINTUCH,S.;SALAZAR,G.M.M. Malfunction of dialysis catheters:management of Fibrin Sheath and related problems.**Tech Vasc Interventional Rad,**v.11,n.3,p.195-200, 2008**.**

FEDERICO, C. Some considerations about the hypercoagulable states and their treatments. **Blood Coagul Fibrinolysis**, v.22, p.155-9, 2011.

FISCHER, F.P. *et al.* Simulation of high-Reynolds number vascular flows. **Comput. Methods Appl. Mech. Engrg**,v.196, p.3049-3060, 2007.

FORAUER, A.R., THEOHARIS, C.G.A., DASIKA, N.L. Jugular vein catheter placement: histologic features and development of catheter-related (Fibrin) sheaths in a swine model.**Radiol**, v.240,n.2, p.427-434,2006.

FRANZ, S. *et al*. Immune responses to implants e A review of the implications for the design of immunomodulatory biomaterials.**Biomater**, v.32, p.6692-6709, 2011.

GERSH, K.C., Edmondson, K.E., Weisel, J.W. Flow rate and fibrin fiber alignment. **J Thromb Haemost**, v. 12, p. 26–28, 2010.

GIDASPOW, D.; HUANG,J. Kinetic theory based model for blood flow and its viscosity. **Ann Biomed Eng,** v.37, n.8, p.1534-1545, 2009.

GOBERT,M.B. et al. Biomaterial-associated thrombosis: roles of coagulation factors,complement, platelets and leukocytes. **Biomater**, v.25, p.5681–5703,2004.

GOUBERGRITS, L. *et al*. CFD analysis in an anatomically realistic coronary artery model based on non-invasive 3D imaging: comparison of magnetic resonance imaging with computed tomography. **Int J Cardiovasc Imaging**, v.2, p.411-421, 2008.

GOUBERGRITS, L. Coronary Artery WSS. Profiling using a geometry reconstruction based on biplane angiography. **Ann Biomed Eng,** v.37, n.4, p.682.691, 2009.

GU, Y. *et al*. Establishment and characterization of an experimental model of coronary thrombotic microembolism in rats. **Am J Pathol**, v.177, n.3, p. 1122-30, 2010.

GUYTON, A., HALL, AC. **Tratado de Fisiologia Médica**.12ª Ed. Rio de janeiro: Elsever, 2011.2300p

HAJBAGHERY, M.A., et al. Quality of care of vascular access in hemodialysis patients in a hemodialysis center in Iran. **J Vasc Nurs**, v.309, p. 24-8, 2012.

HARA, T. *et al*. Molecular imaging of fibrin deposition in deep vein thrombosis using fibrin-targeted near-infrared fluorescence. **JACC : c a r d i o v a s c i m a g i n g**, v.5, n.6,p. 607-15, 2012.

HAYNES, L.M. et al. Dilutional control of prothrombin activation at physiologically relevant shear rates. **Biophys J**, v.100, p.765-773, 2011.

HECHLER, B., GACHET, **C.** Comparison of two murine models of thrombosis induced byatherosclerotic plaque injury. **Thromb Haemost**,v.105, n.1,p. S3–S12, 2011.

HELMCHEN F, DENK W. Deep tissue two-photon microscopy. **Nat Methods**, v. 2, p. 932–40, 2005

HEMMELGARN, B.R., *et al*. Prevention of dialysis catheter malfunction with recombinant tissue plasminogen activator. **N Engl J Med**., v.364, n.4, p.303-12, 2011.

HOSKINS, P.R. Haemodynamics and blood flow measured using ultrasound imaging. **J Eng Med,** v.224, p.255-271, 2010.

JAMES, E.S. *et al*. Reporting standards for central venous access. **J Vasc Interv Radiol,** v.14, 2003.

KAMOCKA, M.M. *et al.*Two-photon intravital imaging of thrombus development. **J Biomed Opt**, v. 15, p. 016020, 2010.

KANIANTA,V. *et al*. Validation of a fluid–structure interaction numerical model for predicting flow transients in arteries. **J Biomech,** v.23, p.1-8, 2009.

KHARBOUTLY, Z.V. *et al*.Numerical and experimental study of blood flow through a patient-specific arteriovenous fistula used for hemodialysis. **Med Eng Phys**, v.32, p.111-118, 2010.

KIM. K, B. *et al*. Novel antiplatelet activity of protocatechuic acid through the inhibition of high shear stress-induced platelet aggregation. **J Pharmacol Exp Ther**,v.343, p.704-711, 2012

KNUTTINEN, M.G. *et al*. A Review of evolving dialysis catheter technologies. **Semin Intervent Radiol**, v.26, n.2, p. 106–114, 2009.

KOIOKE, Y., TANAKA, K., OKUGAWA,Y. In vivo real-time two-photon microscopic imaging of platelet aggregation induced by selective laser irradiation to the endothelium created in the beta-actin-green fluorescent. **J Thromb Thrombolysis**, v.32, p.138-45, 2011.

KONINGS, J. *et al*. Factor XIIa regulates the structure of the fibrin clot independently of thrombin generation through direct interaction with fibrin. **Blood**, v.118, n.14, p.3942-51, 2011.

KONSTANTINOU, E.A., *et al*. Greece reports prototype intervention with first peripherally inserted central catheter: case report and literature review. **J Vasc Nurs**, v.30, p. 88-93, 2012.

KWAK, D., WU, Y., HORBETT, T. A. Fibrinogen and von Willebrand's factor adsorption are both required for platelet adhesion from sheared suspensions to polyethylene preadsorbed with blood plasma. **J Biomed Mater Res A**, v.74, n.1, p.69-83,2005.

JACKSON, S.P. The growing complexity of platelet aggregation. **Blood**, v.109, n.12, p.5087-5095, 2007.

PRAIRIE TECHNOLOGIES. **Ultima Multiphoton Microscopy System User Manual version 2.5**. Middleton, WI, 2009.

LEE, H.J. *et al*. A comparison of standard dual-tip hemodialysis catheter split lumen hemodialysis catheter. **Clin Imag**, v.6, 2012

LI, R. *et al*. Monomeric C-reactive protein alters fibrin clot properties on endothelial cells.**Thromb Res,**v.129,p. e251–e256, 2012.

LIN, S.K., CHANG, Y.J., YANG, F.Y. Hemodynamics of the Internal Jugular Vein: an Ultrasonographic Study. **Tzu Chi Med J**, v.21, p. 317-322, 2009.

LIU, X. *et al*. Effect of non-Newtonian and pulsatile blood flow on mass transport in the human aorta. **J.Biomech**, v.44, p.1123-1131, 2011.

LONGSTAFF, C. The interplay between tissue plasminogen activator domains and fibrin structures in the regulation of fibrinolysis: kinetic and microscopic studies. **Blood J Hemat**, v.117, p.661-668, 2011.

LONYAI, A., *et al*. New Insights into pacemaker lead-induced venous occlusion: simulation-based investigation of alterations in venous biomechanics. **Cardiovsac Eng**, v.10, n.2, p.84-90, 2010

LORD,S.T. Molecular mechanisms affecting fibrin structure and stability. **Arterioscler Thromb Vasc Biol,** v.31, p.494-499, 2011.

LOWE, GD. Common risk factors for both arterial and venous thrombosis. **Br Journal Hematol**, v. 140,p. 488-95, 2008.

LIEBESKIND, D.S.CT and MRI Early Vessel Signs Reflect Clot Composition in Acute Stroke. **J Am Heart Assoc**,v.42, n.10, p.1237-1243,2011.

MAZUR, P. *et al*. R. Architecture of fibrin network inside thrombotic material obtained from the right atrium and pulmonary arteries: flow and location matter. **Thromb Thrombolysis**,v.35, p.127-129, 2013.

MEIR,H.S.,BILALI,A.,KOENIGSBERG,M.Understanding the Spectral Doppler Waveform of the Hepatic Veins in Health and Disease. **Radiographics**, v.29, p.2081-2098, 2009.

MORI, D. et al. Computational study on effect of red blood cells on primary thrombus formation. **Thrombosis Research,** v.123, p.114-121, 2008.

MORAN, J.E., ASH, S.R., ASDIN Clinical Practice Committee. Locking solutions for hemodialysis catheters; heparin and citrate--a position paper by ASDIN. **Semin Dial**, v.21, n.5, p.490-2, 2008.

NAZAKAWA,N. Infectious and thrombotic complications of central venous catheters. **Sem Oncol Nur,** v.26, n.2, p.121-131, 2010.

NEEVES,K.B., ILLING, D. A. R., DIAMOND, S. L. Thrombin flux and wall shear rate regulate fibrin fiber deposition state during polymerization under flow, **Biophyl J**, v.98,p.1344-1352, 2010.

NESBITT, W.S. *et al*. A shear gradient–dependent platelet aggregation mechanism drives thrombus formation. **Nature Med**, v. 15, p. 665 – 673, 2009.

O'CALLAGHAN, S. *et al*. Numerical oxygen of Newtonian and non-Newtonian representation of blood in a distal end-to-side vascular bypass graft anastomosis. **Med Eng Phys**, v. 28 p.70–74, 2006.

OGUZCURT, L. *et al*.Impact of short-term hemodialysis catheters on the central veins: a catheter venographic study.**Europ J Radiol**,v.53, n.3,p.293-299,2004.

OLIVER, J.M. *et al*. Catheter Patency and Function after Catheter Sheath Disruption: A Pilot Study. **Clin J Am Soc Nephrol**, v.2, p.1201-1206, 2007.

PARA, A. *et al*. Rapid Platelet Accumulation Leading to Thrombotic Occlusion. **Ann Biomed Eng**,v.39, n.6, p.1961-71, 2011

PARK, H.P. *et al.* Albumin therapy augments the effect of thrombolysis on local vascular dynamics in a rat model of arteriolar thrombosis: a two-photon laser-scanning microscopy study. **Stroke**, v.39, p.1556–62, 2008.

PARK, J.Y. The Need of Slanted Side Holes for Venous Cannulae. **Comput Math Method Med**, v. 2012,p. 1-7, 2012.

PAUL, C. et al. Large–Eddy simulation of pulsatile blood flow**. Med Eng Phys**,v.31, p.153-159, 2009.

PRADO, P.A., *et al*. Scanning electron microscopy analysis of luminal inflammation induced by different types of coronary stent in an animal model. **Rev Esp Cardiol**, v.64, p. 159-62, 2011.

PENNATI, G. *et al*. Numerical Simulation of Thrombus Aspiration in Two Realistic Models of Catheter Tips. **Artificial Organs***,* v.34, p.301–310, 2010.

PRETORIUS, E. *et al.* A descriptive investigation of the ultrastructure of fibrin networks in thromboembolic ischemic stroke. **J Thromb Thrombolysis**, v.31, p.507–513, 2011.

RAUTH,T.P. *et al.* Central venous catheter placement at the time of extracorporeal membrane oxygennation decannulation: is it safe? **J Pediatr Surg**, v.43, p.53-58, 2008.

ROACH, P. et al. Interpretation of protein adsorption: surface-induced conformational changes, **JAm Chem Soc**, v. 127, p. 8168-8173,2005.

RONCO,C., LEVIN, N.W. Hemodialysis vascular access and peritoneal dialysis acess. **Basel (Switzerland): karger**; 2004.

ROSALES, M. *et al*. Modelling of image-catheter motion for 3-D IVUS. **Med Image Anal**, v.13, p.91-104, 2009.

RUBENSTEIN, A.D., YIN,W. Quantifying the effects of shear stress and shear exposure duration regulation on flow induced platelet activation and aggregation. **J Thromb Thrombolysis**, v.30, p.36–45, 2010.

RUGGERI, Z.M. Platelet Adhesion under Flow. **Microcirc,** v.16, n.1, p.58-83, 2009.

RUMBAUT, R.E., THIAGARAJAN,P. Platelet-Vessel wall Interactions in hemostasis and thrombosis. Morgan & Claypool, 66p, 2010.

SCHILD S. Maintaining vascular access: the management of hemodialysis arteriovenous grafts. **J Vas Access**, v. 11,p. 92-9, 2011.

SHERERTZ, R.J. *et al*. Comparative in vitro efficacies of various catheter lock solutions. **Antimicrob Agents Chemother**, v.50, p. 1865-8, 2006.

SHERIFF, J., D. *et al*. High-shear stress sensitizes platelets to subsequent low-shear conditions. **Ann Biomed Eng**, v. 38, p. 1442–1450, 2010.

SILVAIN, J.J., COLLET,P, NAGASWAMI,C. Composition of coronary thrombus in acute myocardial infarction. **J Am Coll Cardiol**, v.57, p.1359-1367, 2011.

SING, M.A., WANG, S.L. Modeling blood flow in a tilted inferior vena cava filter: does tilt adversely affect hemodynamics? **J Vasc Interv Radiol**, v.22, p. 229-235, 2011.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA (SBN). Censos. **Censo Brasileiro de Diálise 2010**. [cited 2012 Oct 17]. Available from: http://www.sbn.org.br/index.php?censoAdmAtual&menu=24.

SOULIS, J.V. *et al.* Non-newtonian models for molecular viscosity and wall shear stress in a 3D reconstructed human left coronary artery. **Med Eng Phys**,v.30, p.9-19, 2008.

STADTLÄNDER, C.T.K.H. Scanning electron microscopy and transmission electron microscopy of mollicutes: **challenges and opportunities.** Modern Research and Educational Topics in Microscopy. Formatex, 2007.

SUGITA,C. Factor VIII contributes to platelet-fibrin thrombus formation via thrombin generation under low shear conditions. **Thromb Res**, v.124, p. 601-607, 2009.

SUN,Q. *et al*. Influence of antegrade pulmonary blood flow on the hemodynamic performance of bidirectional cavopulmonary anastomosis: a numerical study. **Med Eng Phys**, v.31, p. 227-233, 2009.

SWAMINATHAN,N. Hemocompatibility and endothelialization of elastin and collagen scaffolds: the role of plasma proteins, shear stress and integrins.2010.137f. Master of Science in Bioengineering. **Graduate School of Clemson University,** Clemson, South Carolina,2010.

TAL, M., Ni, N. Features of chronic hemodialysis catheters and common complications. **Dial Traspl**, v.31, n.1, p.17-20, 2010.

THEVENOT,P.,HU,W.,TANG,L. Surface chemistry influence implant biocompatibility. **Curr Top Med Chem,** v.8, n.4, p.270–280, 2008.

THOMAS, M.;VESELY,M. Central venous catheter tip position: a continuing controversy, **J Vasc Interv Radiol**, v.14, 2003.

THOMPSON,C.A. *et al.* Time dependent vascular and myocardial responses of a second generation, small vessel, paclitaxel-eluting stent platform. **Catheter Cardio Inte**, v.73, p.597-604, 2009.

TOKAREV, A. A., BUTYLIN, A. A., ATAULLAKHANOV, I. Platelet adhesion from shear blood flow is controlled by near-wall rebounding collisions with erythrocytes. **Biophys J**, v.100, p.799-808, 2011.

TSAI, P.S., KLEINFELD,D. In vivo two-photon laser scanning microscopy with concurrent plasma-mediated ablation principles and hardware realization.In: FROSTIG, R.D. **In Vivo Optical Imaging of Brain Function**. 2d. Boca Raton (FL): CRC Press, 2009.p.61-112.

USCHIDA, Y. *et al*. Characterization of coronary fibrin thrombus in patients with acute coronary syndrome using dye-staining angioscopy. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v.31, n.17, p.1452-1460,2011.

VAN ROODEN, C.J. Deep vein thrombosis associated with central venous catheters – a review. **J Thromb Haemo**, v.3,p. 2409–2419,2005.

VERSTEEG, H.K., MALALASEKERA,W. An introduction to computational fluid dynamics: **the finite volume method**, 2 ed, England:Pearson Education Limited, 2007.

VON BRÜHL, M.L. *et al.* Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. **J Exp Med***,* v.209, p.819:839, 2012.

XING-YUE, H.U. *et al*. Differentiation of white and red thrombus with magnetic resonance imaging: a phantom study. **Chi Med J**, v.125, n.11, p.1889-1892, 2012.

XU, L.C. *et al*. Dynamics of hydrated polyurethane biomaterials: Surface microphase restructuring, protein activity and platelet adhesion. **Acta biomater**,v.6, p.1938-47, 2010.

WANG, D.; BERNSDORFF,J. Lattice Boltzmann simulation of steady non-newtonian blood flow in a 3D generic stenosis case. **Comput Math Applic**,v.58,p.1030-1034, 2009.

WANG,I. *et al*. Analysis of flow and wall shear stress in the peroneal veins under external compression based on real-time MR images. **Med Eng Phys***,*v.34,p.17-27, 2012.

WEBER, P.W. *et al*. Modifying peripheral IV catheters with side holes and side slits results in favorable changes in fluid dynamic properties during the injection of iodinated contrast material. **AJR Am J Roentgenol**.v.193, n.4, p.970-7, 2009.

WEISEL, J.W. Structure of fibrin: impact on clot stability. **J Thromb Haemost**, v.5, p. 116-24, 2007.

WELLINGS,P.J. Mechanisms of platelet capture under very high shear.2011.87f. **Dissertação Mestrado em Science in Bioengineering**, Georgia Institute of Technology, Georgia, Atlanta,2011

WHITTAKER, P., PRZYKLENK, K. Fibrin architecture in clots: a quantitative polarized light microscopy analysis. **Blood Cells Mol *Dis,*** v. 42, p.51–56, 2009.

WHONER, N. *et al*. Modulation of the von Willebrand factor-dependent platelet adhesion through alternative proteolytic pathways. **Thromb Res**, v. 129, p. e41–e46, 2012.

WILLICOMBE, M.K., VERNON, K., DAVENPORT, A. Embolic complications from central venous hemodialysis catheters used with hypertonic citrate locking solution. **Am J Kidney Dis**, v. 55, p.348-52, 2010.

WOLBERG, A.S. Thrombin generation, fibrin clot formation and hemostasis. **Transfus Apher Sci**, v.38, p.15-23, 2008.

WU*,Y. et al.* Effect of adsorbed von Willebrand factor and fibrinogen on platelet interactions with synthetic materials under flow conditions. **j Biomed Mater Res A**,v.85,n.3,p.829-39, 2008.

WU,Y. et al.The role of adsorbed fibrinogen in platelet adhesion to polyurethane surfaces: A comparison of surface hydrophobicity, protein adsorption, monoclonal antibody binding, and platelet adhesion. **J Biomed Mater Res A**., v.74, n.4, p.722-38, 2005.

XU, L.C., RUNT, J.,SIEDLECKI, C. A. . Dynamics of hydrated polyurethane biomaterials: Surface microphase restructuring, protein activity and platelet adhesion. **Acta Biomater***,*v.6, p.1938-1947, 2009.

YARDIM, H. *et al*. Assessment of internal jugular vein thrombosis due to central venous catheter in hemodialysis patients: a retrospective and prospective serial evaluation with ultrasonography. **Clin Appl Thromb Hemost**, n.4, p.1-4, 2012.

YIN, W., SHANMUGAVELAYUDAM, S.K., RUBENSTEIN, D.A. The effect of physiologically relevant dynamic shear stress on platelet and endothelial cell activation. **Thromb Res**, v.127, p.235–241, 2011.

YUAN, H. et al. The unfolded von Willebrand factor response in bloodstream: the self-association perspective. **J Hematol Oncol**, v.5, n.65, p.1-10, 2012.

YUMING, M., LINA, G., CHUNMEI, W. Histological observation of urokinase and glycoprotein iib/iiia-targeted microbubbles prepared by direct conjugation method to dissolve the thrombi in vivo. **Heart**,v.97, n.21, p. A49, 2011.

ZENG, H.; ZHAO,Y. Rheological analysis of non-Newtonian blood flow using a microfluidic device. **Sensors and Actuators**, v.25, p.687-699, 2010.

ZHANG, Y.*et al* . In vivo near-infrared imaging of fibrin deposition in thromboembolic stroke in mice. **PLoS ONE**, v.7, n.1,p. e30262, 2012.

ANEXO A

Comitê de ética obtido na cidade de Trento/Italia

Azienda Provinciale per i Servizi Sanitari
Provincia Autonoma di Trento

COMITATO ETICO PER LE SPERIMENTAZIONI CLINICHE

ID 14820612
Class. II.9

VERBALE N. 4 / 2010

RIUNIONE DEL 23 GIUGNO 2010

Il giorno 23 giugno 2010 alle ore 14:00 il Comitato Etico per le Sperimentazioni Cliniche si riunisce nella sala riunioni dell'Azienda Provinciale per i Servizi Sanitari.

(Omissis)

Con la nota di convocazione è stato inviato ai componenti del Comitato Etico il materiale relativo agli argomenti all'ordine del giorno.

Sono presenti alla seduta, quali membri del Comitato Etico:

1. dott. Gianni Tognoni (direttore del Consorzio Mario Negri Sud) con funzioni di presidente
2. dott.ssa Marina Ferri (dirigente farmacista del Servizio Farmaceutico)
3. dott. Flavio Corradini (comitato difesa dei consumatori)
4. dott.ssa Giuseppina Ciradio (dirigente medico della U.O. di Medicina Legale)
5. dott. Flavio Corradini, Comitato difesa dei consumatori
6. prof. Roberto Corrocher (professore ordinario di Medicina Interna presso la facoltà di Medicina e chirurgia dell'università degli studi di Verona)
7. dott.ssa Maria Vittoria Danovaro (responsabile del Servizio Affari Generali e Legali)
8. dott. Renzo Girardello (direttore della U.O. di Geriatria dell'Ospedale di Rovereto)
9. sig.ra Roberta Iori (infermiera professionale della U.O. di Cardiologia dell'Ospedale di Trento)
10. dott.ssa Loreta Rocchetti (medico di medicina generale)

dott.ssa Michela Cerzani con funzioni di segreteria scientifica
E' presente alla seduta come uditore la dott.ssa Francesca Spadaro (farmacista del Servizio Farmaceutico)

Sede legale: via Degasperi, 79 - 38123 Trento - P.IVA e C.F. 01429410226 www.apss.tn.it

Assenti giustificati:

1. prof. Carlo Casonato (professore straordinario di Diritto pubblico comparato presso la facoltà di Giurisprudenza dell'Università degli studi di Trento)
2. prof. Enzo Galligioni (direttore della U.O. di Oncologia medica dell'Ospedale di Trento)
3. dott. Pierantonio Scappini (direttore della Direzione Medica del Presidio Ospedaliero di Cles)
4. prof. Alberto Turco (professore associato di Genetica medica presso la facoltà di Medicina dell'Università degli studi di Verona)
5. prof.ssa Maria Elisabetta Zandiri (professore associato di Statistica Medica presso la facoltà di Medicina dell'Università degli studi di Verona)

Preso atto della presenza del numero legale dei componenti, alle ore 14.00 il Presidente dichiara aperta la seduta del Comitato Etico.

I componenti del Comitato Etico dichiarano che si asterranno dal pronunciarsi su quegli studi per i quali possa sussistere un conflitto di interessi di tipo diretto o indiretto.

(Omissis)

I. NUOVE VALUTAZIONI

(Omissis)

Codice protocollo	CVC-med
Numero eudraCT	n.a.
Titolo del protocollo	Valutazione comparativa del profilo di efficacia e sicurezza attribuibile (effectiveness) dei CVC medicati
Tipo di studio	Osservazionale indipendente (D.M. 17 12 2004)
Fase	n.a.
Promotore	Dott. Edoardo Geat – U.O. Anestesia e Terapia Intensiva - Osp. S. Chiara – Trento
Centro coordinatore	n.a.
Sperimentatore principale locale	Dott. Edoardo Geat
Unità Operativa	Anestesia e Terapia Intensiva - Osp. S. Chiara – Trento
Responsabile U.O.	Dott. Edoardo Geat
N. soggetti previsti nel centro locale	316 (158 gruppo test, 158 gruppo controllo)
Farmaci e materiale forniti dal promotore	n.a.
Prestazioni assistenziali aggiuntive	No
Convenzione economica	No
Costi aggiuntivi	No – utilizzo di CVC compresi nel contratto di aggiudicazione per la fornitura di cateteri venosi in APSS
Polizza assicurativa	Polizza R.C.T. dell'APSS

(Omissis)

Presentano lo studio il Dott. Edoardo Geat, il Dott. Giandomenico Nollo (Facoltà di Fisica, Università di Trento) e la Dott. Francesco Tessarolo (Facoltà di Fisica, Università di Trento).

Il dott. Gianni Tognoni si astiene dalla valutazione dello studio.

E' disponibile per la discussione il materiale di cui si riportano i seguenti dati sintetici:

- Domanda per l'autorizzazione alla conduzione di sperimentazioni cliniche non farmacologiche/studi osservazionali indipendenti (Modulo 1/INDIP)
- Dichiarazione del promotore di ricerche indipendenti (Modulo 2/INDIP)
- Dichiarazione sulla natura osservazionale dello studio (Modulo 3)
- Dichiarazione pubblica sul conflitto di interessi (Modulo 4)
- Protocollo di ricerca, versione 1, 23 giugno 2010
- Procedura operativa, versione , 23 giugno 2010
- Scheda raccolta dati – settore terapia intensiva
- Sinossi e razionale, protocollo di ricerca versione 23 giugno 2010
- Dati in formato elettronico su CD-ROM

(Omissis)

Sede legale: via Degasperi, 79 - 38123 Trento - P.IVA e C.F. 01429410226 www.apss.tn.it

VALUTAZIONE DEL COMITATO ETICO

Il Comitato etico ritiene che il quesito clinico dello studio sia clinicamente rilevante, dal momento che nasce da un'esigenza conoscitiva non soddisfatta dei medici che utilizzano questi dispositivi. Inoltre, i criteri di *effectiveness*, secondo i quali è stato pensato, rendono il protocollo particolarmente adatto al miglioramento della pratica clinica assistenziale.

Il Comitato etico esprime

- [x] **PARERE FAVOREVOLE**
- [ ] PARERE NON FAVOREVOLE
- [ ] SOSPENSIONE IN ATTESA DEI SEGUENTI CHIARIMENTI/INTEGRAZIONI

Il Comitato, poiché lo studio prevede il coinvolgimento del Dipartimento di Fisica dell'Università di Trento, trasmetterà il presente parere anche al Comitato Etico dell'Università.

Il Presidente del Comitato Etico
dott. Gianni Tognoni

la verbalizzante
dott.ssa Michela Cerzani

Sede legale: via Degasperi, 79 - 38123 Trento - P.IVA e C.F. 01429410226 www.apss.tn.it

ANEXO B

Formulário:

SCHEDA RACCOLTA DATI
Progetto RuBiCat – Settore Nefrologia

DATI PAZIENTE

Nome: _____

Cognome: _____

Data nascita: ____/____/_____

Sesso: ☐M ☐F

DATI INSERIMENTO CATETERE

Data inserimento catetere: ____/____/_____

Modello dispositivo:

☐ Tunnelizzato
☐ Non-tunnelizzato

Punto di inserimento del dispositivo:

☐ giugulare dx
☐ giugulare sin
☐ succlavia dx
☐ succlavia sin
☐ altro_____

Modello catetere (nome modello, produttore, diametro):

_____

_____

_____

DATI MANTENIMENTO CATETERE

Utilizzo di urochinasi:

☐ No ☐ Sì in data ____/____/_____

Terapia anticoaglulante:

_____

Procedure emodialitiche/settimana:

☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4

DATI RIMOZIONE CATETERE

Data rimozione catetere: ____/____/_____

Causa della rimozione:

☐ Rimozione in elezione
☐ Mobilizzazione
☐ Infezione
☐ Problemi di flusso
☐ Rottura catetere (hub, lumi)
☐ Malposizionamento

Parametri biochimici e ematologici al momento della inserzione e rimozione:

PT: _____ s

PTT: _____ s

Piastrine: _____ /µl

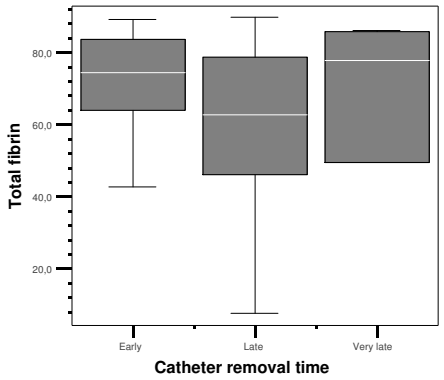
---------- La compilazione del campo sottostante ----------
è a cura della Sezione di microscopia elettronica

Codice progressivo catetere CD ☐☐☐

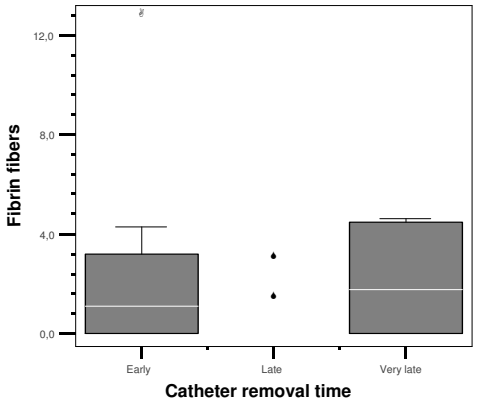
ANEXO C

Dados referents a analise de MEV:

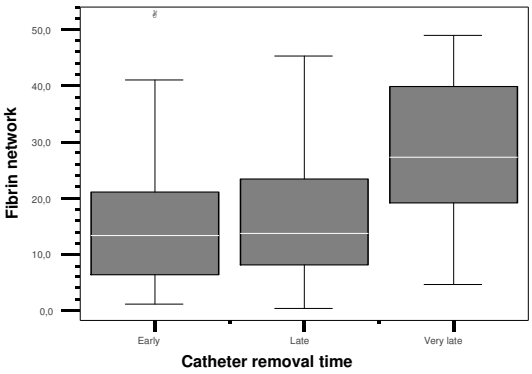
- Intervalo de tempo:
  - *Early (1-15gg)*
  - *Late (16-60gg)*
  - *Very late (>60gg)*



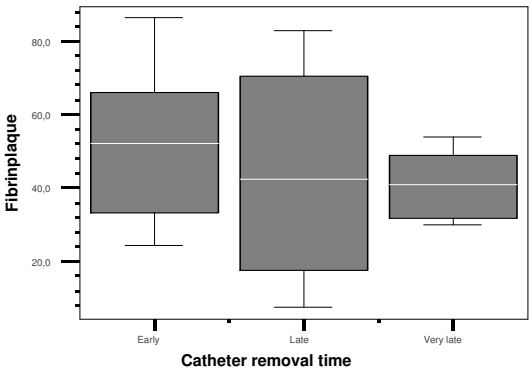
Box Plot referente à fibrina total e o tempo de permanência



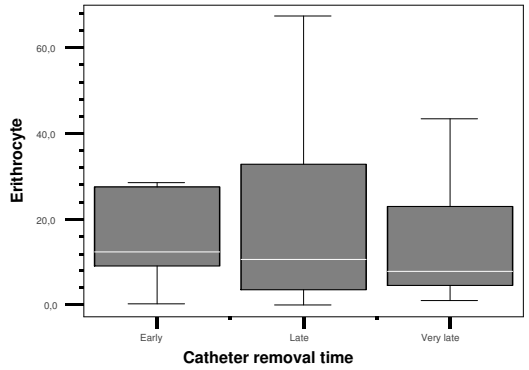
Box plot referente às fibras de fibrina e ao tempo de permanência



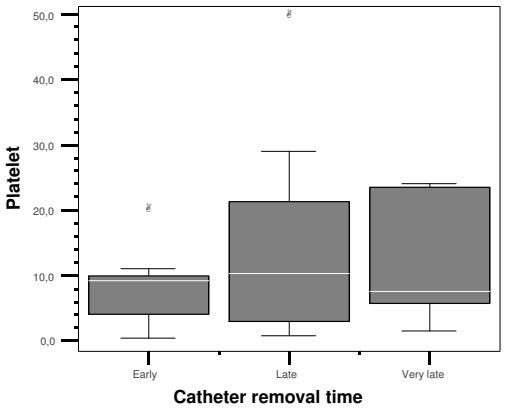
Box plot referente à rede de fibrina e ao tempo de permanência



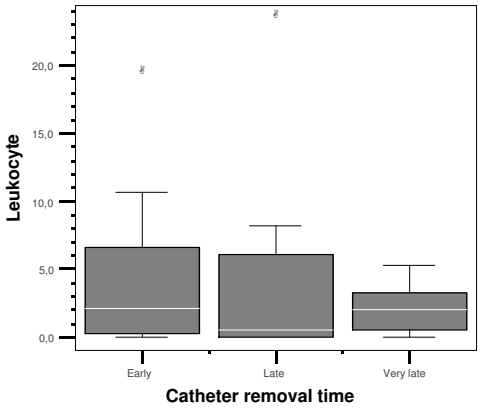
Box plot referente à placa de fibrina e ao tempo de permanência



Box plot referente aos eritrócitos e ao tempo de permanência

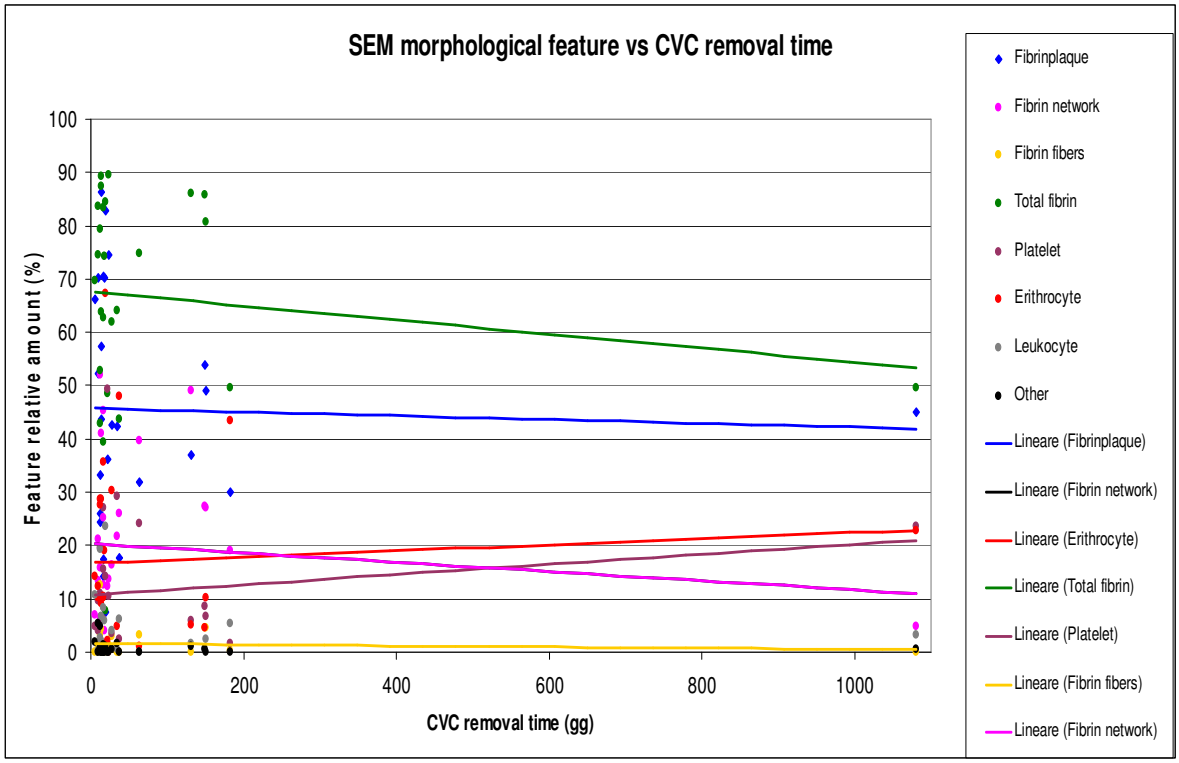


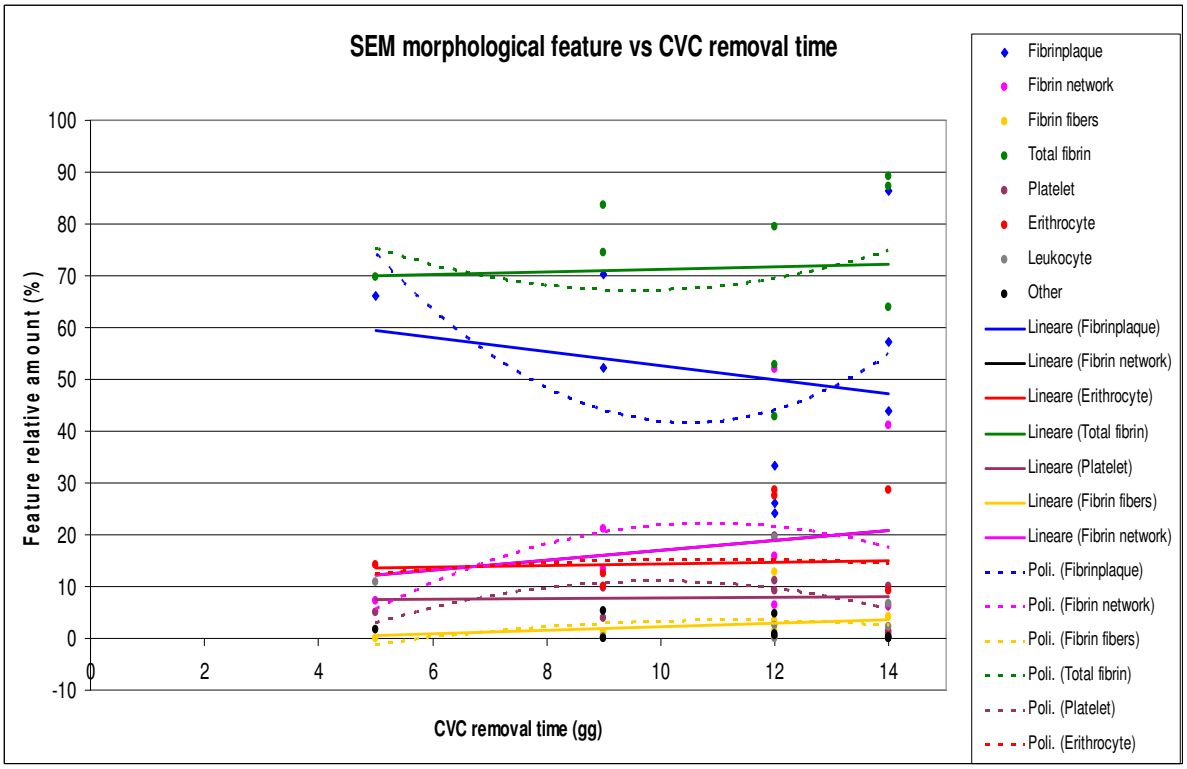
Box plot referente às plaquetas e ao tempo de permanência

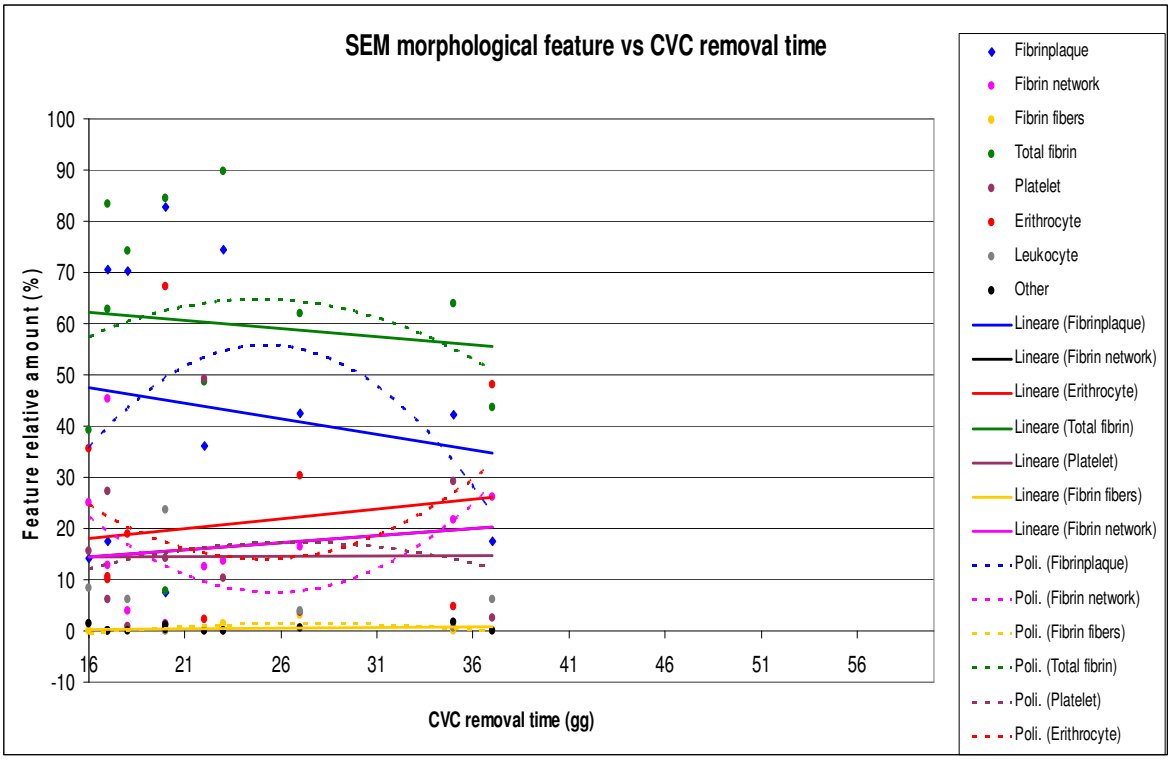


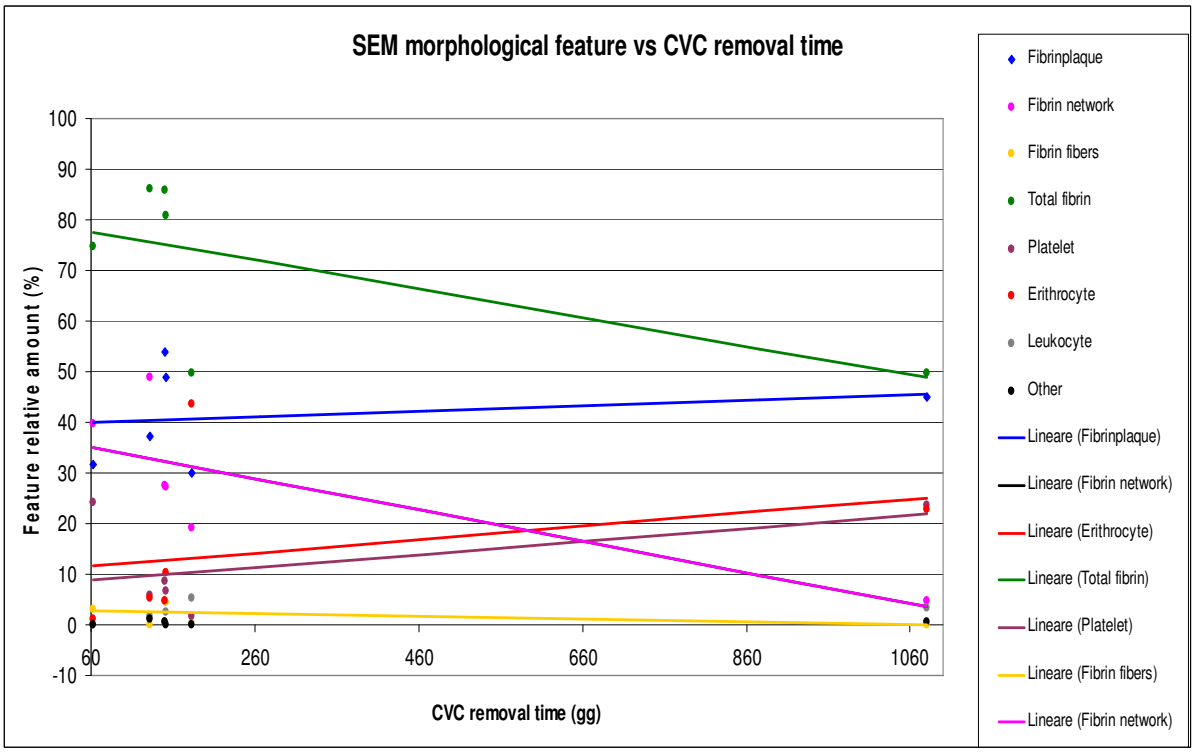
Box plot referente aos leucócitos e ao tempo de permanência

Análise referente às características micro-morfológicas em MEV versus tempo de permanência:






SEM morphological feature vs CVC removal time
Feature relative amount (%)
CVC removal time (gg)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
-10
16
21
26
31
36
41
46
51
56
Fibrinplaque
Fibrin network
Fibrin fibers
Total fibrin
Platelet
Erithrocyte
Leukocyte
Other
Lineare (Fibrinplaque)
Lineare (Fibrin network)
Lineare (Erithrocyte)
Lineare (Total fibrin)
Lineare (Platelet)
Lineare (Fibrin fibers)
Lineare (Fibrin network)
Poli. (Fibrinplaque)
Poli. (Fibrin network)
Poli. (Fibrin fibers)
Poli. (Total fibrin)
Poli. (Platelet)
Poli. (Erithrocyte)


SEM morphological feature vs CVC removal time
Feature relative amount (%)
CVC removal time (gg)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
-10
60
260
460
660
860
1060
Fibrinplaque
Fibrin network
Fibrin fibers
Total fibrin
Platelet
Erithrocyte
Leukocyte
Other
Lineare (Fibrinplaque)
Lineare (Fibrin network)
Lineare (Erithrocyte)
Lineare (Total fibrin)
Lineare (Platelet)
Lineare (Fibrin fibers)
Lineare (Fibrin network)

Análise do teste quantitiativo nos dados obtidos pela microscopia de fluorescência:

Group 1 (0-15days) Shapiro-Wilk test for normality of fluorescence-fibrin values: p=0.575 data are normally distributed

Mean=58
StDev=20
StErr=7

Group 2 (16-60 days)
Shapiro-Wilk test for normality of fluorescence-fibrin values: p=0.187 data are normally distributed

Mean=39
StDev=13
StErr=4

Group 3: (>60 days)
Shapiro-Wilk test for normality of fluorescence-fibrin values: p=0.876 data are normally distributed

Mean=43
StDev=13
StErr=5

T-test to compare mean values of the three groups:

Group 1 vs Group 2 t-test unpaired p=0.028 the two distribution are significantly different
Group 1 vs Group 3 t-test unpaired p=0.120 no significance

Group 2 vs Group 3 t-test unpaired p=0.512 no significance

Analise estatistica da % área de fibrina fluorescente de dois grupos que utlizavam o CVC não tunelizado de acordo com o tempo de permanência:

Group 1: 0-15days
Group 2: >15 days

Only non tunnelled Medcomp silicone CVC were included. Total samples number=22
Check for normality distribution of the whole dataset:
Shapiro-Wilk test for normality of fluorescence-fibrin values on the whole dataset: p=0.80 data are normally distributed

Mean=48
StDev=17

Creation of the exclusion criteria: data are accepted if closer than 2*StDev from the mean.
lower limit=48-2*17=14
upper limit=48+2*17=82

this brings to the exclusion of
CVC n°5 (fluo-fibrin=95)
CVCn°65 (fluo-fibrin=14)

Only 20 CVC are now considered.

Group 1: 8 CVC

Shapiro-Wilk test for normality of fluorescence-fibrin values: p=0.386 data are normally distributed

Mean=53
StDev=15
StErr=5

Group 2: 12 CVC

Shapiro-Wilk test for normality of fluorescence-fibrin values: p=0.138 data are normally distributed

Mean=43
StDev=8
StErr=2

T-test to compare mean values of the two groups:

Group 1 vs Group 2 t-test unpaired p=0.083 no significance

Análise estatística de correlação entre fibrina fluorescente e valores bioquímicos do sangue independente do tempo de permanecia e do tipo de CVC:

No CVC type selection. Total samples number=29

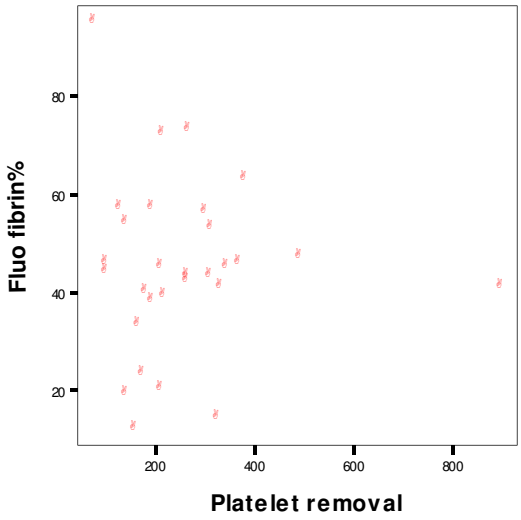
Coorelation is checked between the following entities:

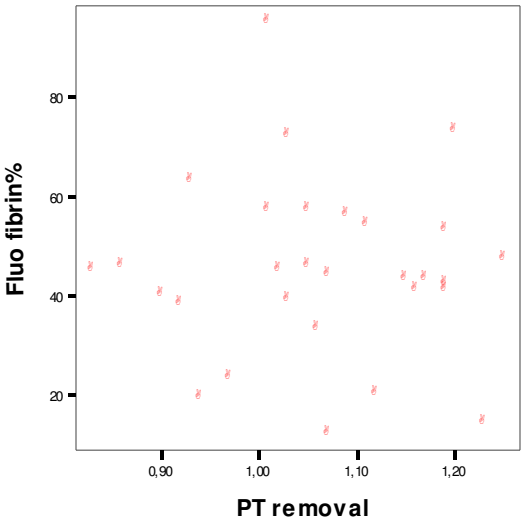
fluorescent-fibrin vs PT

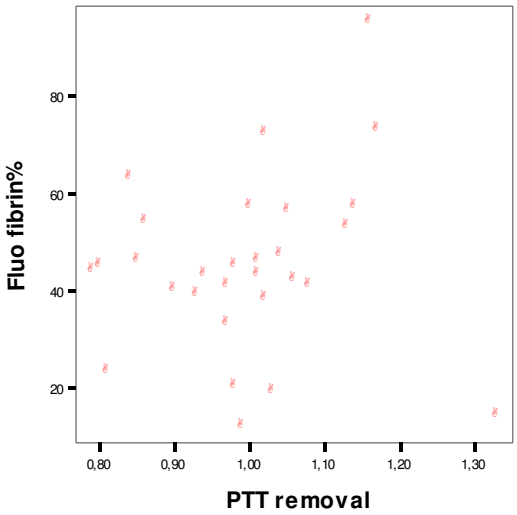
fluorescent-fibrin vs PTT

fluorescent-fibrin vs Platelets

Scatter plots:





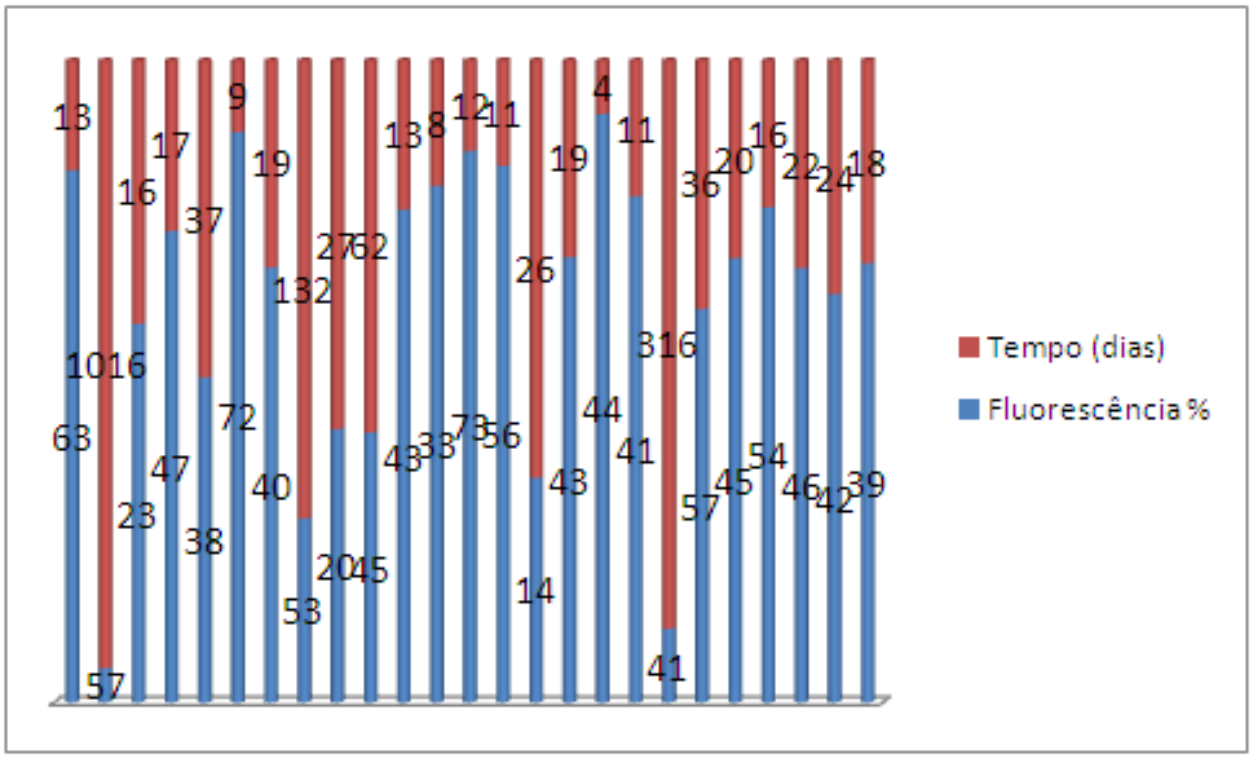


Correlation and was checked with Pearson test. No significant correation was found.

Non parametric correlation was checked with Spearman test. No significant correlation was found.

ANEXO D

Relação entre o tempo de permanência e a região de alta fluorescência (fibrina) encontrada na microscopia de fluorescência.



Análise quantitativa do trombo pela microscopia de fluorescência

NºCVC	% fluo	% fluo	% fluo		
	1 medida	2 medida	3 medida	Média	Desvio Padrão
CD70	39	43	42	**41**	2,1
CD68	14	10	11	**12**	2,1
CD66	44	42	43	**43**	0,8
CD63	54	55	58	**56**	2,0
CD82	42	44	39	**42**	2,5
CD65	12	15	16	**14**	2,1
CD62	72	70	75	**73**	2,4
CD53	43	41	46	**43**	2,5
CD61	31	33	36	**33**	2,6
CD67	43	44	44	**44**	0,6
CD52	44	48	42	**45**	3,1
CD72	56	57	58	**57**	1,0
CD73	43	46	47	**45**	2,1
CD56	95	96	94	**95**	1,0
CD77	56	55	50	**54**	3,2
CD79	43	47	47	**46**	2,3
CD84	37	41	39	**39**	2,1
CD86	44	45	48	**46**	2,2
CD87	28	24	25	**26**	2,1
CD8	62	64	63	**63**	1,0
CD7	47	43	48	**46**	2,6
CD6	19	18	20	**19**	1,0
CD11	55	57	60	**57**	2,7
CD13	22	21	26	**23**	2,6
CD14	45	48	48	**47**	1,7
CD15	39	40	35	**38**	2,6
CD17	75	70	71	**72**	2,6
CD20	55	51	53	**53**	2,0
CD21	20	19	21	**20**	1,0
CD69	42	42	39	**41**	1,7
CD18	39	38	42	**40**	2,0

Análise quantitativa das estruturas micro-morfológicas realizada nos trombos provenientes de orificios venosos dos 29 CVC analisados em MEV

Nº CVC	SEM (Fibrin plaque)	SEM (Fibrin network)	SEM (Fibrin fibres)	SEM (Fibrin total)	SEM (Platelet)	SEM (RBC)	SEM (WBC)	SEM (Other)
5	86,3	1,1	0	87,3	1,4	9,2	2,1	0
6	30,1	19,1	0,4	49,6	1,6	43,5	5,3	0
7	49	27,2	4,5	80,7	6,6	10,3	2,4	0
8	57,3	6,2	0,4	63,9	0,4	28,6	6,6	0,4
9	NO DATA AVAILABLE	NO DATA AVAILABLE	NO DATA AVAILABLE	NO DATA AVAILABLE	NO DATA AVAILABLE	NO DATA AVAILABLE	NO DATA AVAILABLE	NO DATA AVAILABLE
10	NO DATA AVAILABLE	NO DATA AVAILABLE	NO DATA AVAILABLE	NO DATA AVAILABLE	NO DATA AVAILABLE	NO DATA AVAILABLE	NO DATA AVAILABLE	NO DATA AVAILABLE
11	45	4,7	0	49,6	23,6	22,9	3,3	0,5
12	NO DATA AVAILABLE	NO DATA AVAILABLE	NO DATA AVAILABLE	NO DATA AVAILABLE	NO DATA AVAILABLE	NO DATA AVAILABLE	NO DATA AVAILABLE	NO DATA AVAILABLE
13	14,2	25,1	0	39,3	15,5	35,6	8,2	1,4
14	70,6	12,7	0	83,3	6,1	10,5	0	0
15	17,6	26	0	43,6	2,4	48	6,1	0
16	NO DATA AVAILABLE	NO DATA AVAILABLE	NO DATA AVAILABLE	NO DATA AVAILABLE	NO DATA AVAILABLE	NO DATA AVAILABLE	NO DATA AVAILABLE	NO DATA AVAILABLE
17	NO DATA AVAILABLE	NO DATA AVAILABLE	NO DATA AVAILABLE	NO DATA AVAILABLE	NO DATA AVAILABLE	NO DATA AVAILABLE	NO DATA AVAILABLE	NO DATA AVAILABLE
18	70,2	4	0	74,2	0,8	19	6	0
20	37,1	49	0	86,1	5,8	5,2	1,7	1,2
21	NO DATA AVAILABLE	NO DATA AVAILABLE	NO DATA AVAILABLE	NO DATA AVAILABLE	NO DATA AVAILABLE	NO DATA AVAILABLE	NO DATA AVAILABLE	NO DATA AVAILABLE
51	NO DATA AVAILABLE	NO DATA AVAILABLE	NO DATA AVAILABLE	NO DATA AVAILABLE	NO DATA AVAILABLE	NO DATA AVAILABLE	NO DATA AVAILABLE	NO DATA AVAILABLE
52	31,8	39,8	3,1	74,7	24,1	1,1	0	0
53	43,8	41	4,3	89,2	9,9	0,6	0,3	0
61	52,2	21,2	1,1	74,5	9,7	10,1	0,4	5,4
62	70,2	13,3	0	83,6	4	12,4	0	0
63	33,2	6,5	3,2	42,9	9,3	27,5	19,4	0,8
65	42,6	16,3	3	61,9	3,5	30,2	4	0,5
66	7,5	0,4	0	7,8	1,1	67,3	23,5	0,4
67	66,1	7,1	0	69,8	4,9	14,3	10,7	1,8
68	24,2	18,8	11,3	54,2	2,5	33,3	10	0
69	24,3	15,9	12,7	52,9	11,1	28,6	2,6	4,8
70	26	52	1,4	79,4	19,7	0,3	0	0,6
72	42,3	21,7	0	64	29,1	4,8	0,5	1,6
73	82,9	1,5	0	84,4	14,1	0,4	0	1,1
77	17,4	45,3	0	62,8	27,1	10,1	0	0
79	74,5	13,7	1,4	89,6	10,4	0	0	0
82	53,9	27,4	4,6	85,8	8,7	4,6	0,5	0,5
84	36,2	12,4	0	48,6	49,3	2,1	0	0
86	63	19,8	2,9	85,7	12,3	1,6	0	0,3
87	34,1	9,2	3,8	47,1	45,7	2,8	0	0,3