



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Carlos Eduardo Pinheiro Lucio Filho

**Comparação da eficácia e segurança de diferentes tipos
de escleroterápicos utilizados rotineiramente na esclerose
de telangiectasias e veias reticulares: Estudo
experimental em coelhos**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título
de Doutor em Bases Gerais da Cirurgia

Orientador: Prof. Dr Winston Bonetti Yoshida
Co-orientador: Prof. Dr Matheus Bertanha

**Botucatu
2017**

Carlos Eduardo Pinheiro Lucio Filho

Comparação da eficácia e segurança de diferentes tipos de escleroterápicos utilizados rotineiramente na esclerose de telangiectasias e veias reticulares: Estudo experimental em coelhos

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Bases Gerais da Cirurgia

Orientador: Prof. Dr. Winston Bonetti Yoshida
Co-orientador: Prof. Dr. Matheus Bertanha

Botucatu
2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Lucio Filho, Carlos Eduardo Pinheiro.

Comparação da eficácia e segurança de diferentes tipos de escleroterápicos utilizados rotineiramente na esclerose de telangiectasias e veias reticulares : estudo experimental em coelhos / Carlos Eduardo Pinheiro Lucio Filho. - Botucatu, 2017

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Winston Bonetti Yoshida
Coorientador: Matheus Bertanha
Capes: 40102009

1. Veias - Doenças. 2. Varizes. 3. Coelho como animal de laboratório. 4. Escleroterapia. 5. Soluções esclerosantes.

Palavras-chave: Eficácia; Escleroterapia; Modelos de animal experimental; Soluções esclerosantes; Veias varicosas.

Carlos Eduardo Pinheiro Lucio Filho

COMPARAÇÃO DA EFICÁCIA E SEGURANÇA DE DIFERENTES
TIPOS DE ESCLEROTERÁPICOS UTILIZADOS ROTINEIRAMENTE
NA ESCLEROSE DE TELANGIECTASIAS E VEIAS RETICULARES:
ESTUDO EXPERIMENTAL EM COELHOS

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor

Presidente e Orientador: Prof. Titular Dr Winston Bonetti Yoshida
Departamento de Cirurgia e Ortopedia, Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a Assistente Dr^a Regina Moura Ceranto
Departamento de Cirurgia e Ortopedia, Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP

Prof. Dr Rodrigo Gibin Jaldin
Departamento de Cirurgia e Ortopedia, Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP

Prof. Dr Adilson Ferraz Paschôa
Serviço de Vascular Integrada / Beneficência Portuguesa de São Paulo

Prof. Dr Marcondes Antônio de Medeiros Figueiredo
Universidade Federal de Uberlândia, UFU

Botucatu, 23 de maio de 2017, às 9h

Dedicatória

À vovó Terezinha de Jesus Pinheiro Lucio (*in memoriam*)

Ao meu filho Davi Mendes de Carvalho Lucio

Agradecimentos especiais

À Lorena Mendes de Carvalho Lucio, pelo amor, companheirismo, apoio constante e paciência.

Aos meus pais Carlos Eduardo Pinheiro Lucio e Maria Celia Lima Lucio, pelo amor incondicional.

Aos meus irmãos Carla Germana Lima Lucio e Miguel Victor Lima Lucio, pelo companheirismo.

Ao Dr. Reynaldo Mendes de Carvalho Junior e à Dra. Maria Ester Ibiapina Mendes de Carvalho, pelo constante incentivo.

Agradecimentos especiais

Ao meu orientador

Professor Doutor Winston Bonetti Yoshida

Por ter sido mais que um preceptor e orientador, uma pessoa em quem eu me inspiro e me faz buscar ser melhor como profissional e ser humano.

Agradecimentos especiais

Ao meu co-orientador

Professor Doutor Matheus Bertanha

Por me incentivar desde meu ingresso no programa de pós-graduação até a conclusão desta tese, ajudando-me a superar as dificuldades com seu apoio constante, seus ensinamentos e sua amizade.

Agradecimentos

Agradeço a Deus, por ter me dado força e saúde para a conclusão desta jornada.

Ao meu avô Miguel Lima (*in memoriam*), que sempre me inspirou pelo seu espírito guerreiro e batalhador.

Aos meus familiares, pelo apoio, amor e carinho em todos os momentos da minha vida. Agradeço, em especial, à minha madrinha Maria Silvanira Gomes de Lima e à minha tia Maria de Fátima Gomes de Lima, por serem presenças constantes em minha vida.

Aos meus amigos, por estarem sempre próximos para compartilhar as conquistas e alegrias e me ajudarem a enfrentar momentos difíceis.

Aos professores da disciplina de Cirurgia Vasculare da FMB-UNESP (Profa. Dra. Regina Moura Ceranto, Prof. Dr Hamilton Almeida Rollo, Prof. Dr. Rodrigo Gibin Jaldin) que me passaram, em seus inestimáveis ensinamentos e experiências, o amor e dedicação necessários para a carreira de cirurgia vascular.

Ao Prof. Dr. Marcone Lima Sobreira, que acompanhou de perto toda a minha formação desde a Cirurgia Geral, e por ser um amigo, irmão e mestre que levarei por toda a vida.

Aos Cirurgiões Vasculares do Hospital Estadual de Bauru (Luís Mário Bueno, Daniel Kawai e Daniel Colares), sempre muito atenciosos com minha formação.

Ao Dr. Jan Jazen, do laboratório VascPath em Berna, Suíça, que não mediu esforços para a brilhante análise histológica deste trabalho.

Ao amigo patologista Rafael de Deus Moura, pelos importantes esclarecimentos na interpretação das imagens da avaliação microscópica.

Às minhas amigas Nelise Luciano Marvulo Guimarães e Camila André Antunes, por terem sido verdadeiras irmãs durante a trajetória da Residência de Cirurgia Vascular.

Aos amigos de Residência da Cirurgia Vascular Jamil Victor de Oliveira Mariúba, Érika Bonfietti e Rafael Elias Fares Pimenta, que mesmo com o cansaço cotidiano, sempre estiveram dispostos a contribuir com minha formação.

Aos amigos da Cirurgia Geral da FMB-UNESP, parceiros que me acompanharam desde os primeiros passos da residência.

Aos professores da Pós-Graduação em Bases Gerais da Cirurgia da FMB-UNESP, pela disponibilidade, dedicação e esforços constantes.

À professora Dra. Lídia Raquel de Carvalho, que, de maneira dedicada e paciente, deu contribuição fundamental para esta tese, por meio das análises estatísticas realizadas com extrema primazia e prontidão.

Aos meus pacientes, que me ensinaram a ser um profissional mais humano.

À aluna de iniciação científica Marcela Polachini Prata, que me ajudou na execução do trabalho com os coelhos.

A todos os funcionários da UNIPEX da FMB-UNESP e do Hospital das Clínicas da FMB-UNESP que contribuíram para a realização deste trabalho, em especial ao Diego Generoso, que dedicou inúmeras tardes para a realização do trabalho com os coelhos.

À secretária da pós-graduação Márcia Fonseca Piagentini Cruz, pela dedicação, bom-humor e disposição constante em ajudar.

À Rosemary Cristina da Silva e à Rosemeire Aparecida Vicente, funcionárias da Biblioteca da FMB-UNESP, pela revisão das referências e confecção da ficha catalográfica.

Aos funcionários do Laboratório Vascular do Hospital das Clínicas da FMB Teresinha de Fátima Barros, Paula Maria da Silva Monteiro Pereira e Lucas Corneta Rosa, pela amizade e presteza.

" Nossa maior fraqueza está em desistir. O caminho mais certo de vencer é tentar mais uma vez."

Thomas Edison

RESUMO

Lucio Filho CEP. **Comparação da eficácia e segurança de diferentes tipos de escleroterápicos utilizados rotineiramente na esclerose de telangiectasias e veias reticulares: estudo experimental em coelhos** [tese]. Botucatu: Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista; 2017. 58f.

Introdução: A escleroterapia é um procedimento usado para ocluir varizes. Esse tratamento, em geral de fim estético, pode apresentar complicações como flebite, úlcera e hiperpigmentação. Devido à escassez e heterogeneidade de estudos clínicos no tratamento de telangiectasias e veias reticulares, estudos em modelo animal podem trazer respostas mais específicas sobre eficácia e segurança dos agentes esclerosantes. **Objetivos:** O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia e segurança de agentes escleroterápicos, utilizando a veia dorsal marginal da orelha do coelho como modelo experimental. **Materiais e Métodos:** Estudo experimental randomizado aberto utilizando 30 coelhos (60 orelhas) da raça *Norfolk*. As orelhas foram divididas em 5 grupos (12 orelhas por grupo), sendo injetado polidocanol líquido a 1% (Grupo Polidocanol), polidocanol espuma a 1% (Grupo Espuma), solução de polidocanol 0,2% com glicose 70% (Grupo PG), glicose 75% (Grupo Glicose) e salina a 0,9% (Grupo Controle). Foram realizadas fotografias nos momentos antes da injeção, e no 7º, 14º e 21º dias após a escleroterapia. A análise macroscópica foi conduzida por cirurgião vascular sem conhecimento prévio dos grupos. Como parâmetros macroscópicos, avaliaram-se a eficácia do agente, pela presença de esclerose do vaso, e suas complicações (flebite, neovascularização, úlcera em sítio de punção, necrose e processo inflamatório), comparando-se as fotografias pré-tratamento e após 21 dias de tratamento. No 21º dia, procedeu-se a biópsia da orelha do coelho para avaliação histológica (coloração hematoxilina-eosina e elástica van Gieson) e imuno-histoquímica com os marcadores endoteliais CD31 e CD34. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. **Resultados:** Quanto ao resultado de eficácia, a presença de esclerose foi observada em 76,9% das orelhas tratadas com espuma, sendo superior estatisticamente a todos os grupos ($p < 0,001$), exceto o grupo polidocanol (33,3%). Quanto aos resultados de segurança, o grupo espuma teve o maior número de efeitos adversos somando 30,7% de orelhas com necrose ($p = 0,003$), 46,15% com úlcera ($p = 0,003$) e 69,2% com processo inflamatório ($p < 0,0001$), sendo estatisticamente superior aos demais grupos. Apesar de maior frequência de neovascularização no grupo espuma ($n = 7$) em relação aos grupos polidocanol líquido ($n = 3$) e glicose ($n = 3$), não houve diferença significativa entre esses grupos. A flebite no 21º dia esteve presente em 38,46% no grupo espuma e em 8,33% no grupo glicose. À microscopia, o grupo espuma foi superior em relação aos demais quanto ao número de casos de esclerose – eficácia ($n = 9$, $p = 0,0024$) e de necrose - segurança ($n = 3$, $p = 0,03$). **Conclusão:** O presente estudo apontou eficácia macroscópica semelhante entre o polidocanol líquido a 1% e espuma de polidocanol a 1% em promover a esclerose da veia. Microscopicamente, o grupo espuma foi o mais eficaz, porém foi o esclerosante que apresentou mais reações adversas neste modelo experimental.

Palavras-chave: veias varicosas, escleroterapia, soluções esclerosantes, modelos de animal experimental, eficácia, segurança

ABSTRACT

Lucio Filho CEP. **Comparison of the efficacy and safety of different types of sclerosing agents routinely used in telangiectasias and reticular vein sclerosis: an experimental study in rabbits** [thesis]. Botucatu: Botucatu Medical School, Universidade Estadual Paulista; 2017. 58p.

Introduction: Sclerotherapy is a common treatment for reticular veins and telangiectasias. This treatment, usually with aesthetic purpose, may present complications such as phlebitis, ulcer and hyperpigmentation. Clinical trials involving patients with telangiectasias and reticular veins are limited. This study aims to evaluate the efficacy and safety of sclerotherapeutic agents using the marginal dorsal vein of rabbit ear as an experimental model. **Methods:** The study design was an open randomized experimental study using 30 *Norfolk* rabbits (60 ears). The ears were divided into 5 groups (12 ears per group), in which were injected 1% liquid polidocanol (Polidocanol Group), 1% foaming polidocanol (Foam Group), solution of 0.2% polidocanol-glucose 75% (PG Group), Glucose 75% (Glucose Group) and 0.9% saline (Control Group). Photographs were taken before the moment of the injection, and at 7th, 14th and 21st days after the infusion of the sclerotherapeutic agent. A vascular surgeon without previous knowledge of the groups conducted the macroscopic analysis. The following macroscopic findings were evaluated: efficacy of the agent (vessel sclerosis) and complications (phlebitis, neovascularization, ulcer at puncture site, necrosis and local inflammation). On the 21st day after the injection, the rabbits' ears were biopsied for histological analysis with hematoxylin-eosin and Elastica van Gieson staining and immunohistochemistry was conducted using CD31 and CD34 endothelial markers. P values < 0.05 were considered statistically significant. **Results:** The presence of sclerosis was observed in 76.9% of the Foam Group, and had significantly higher frequency than all other groups ($p < 0.001$), except for the polidocanol group (33.3%). The foam group had the highest number of adverse effects, accounting for 30.7% of ears with necrosis ($p = 0.003$), 46.15% with ulcer ($p = 0.003$) and 69.2% with local inflammation ($p < 0.0001$). Despite the greater frequency of neovascularization in the foam group ($n = 7$) in relation to polidocanol ($n = 3$) and glucose ($n = 3$) groups, no significant difference was verified. At the 21st day, there was 38.46% of phlebitis in the foam group and 8.33% in the glucose group. Regarding microscopic analysis, the number of cases of sclerosis ($n = 9$, $p = 0.0024$) and necrosis ($n = 3$, $p = 0.03$) in the foam group was also higher than others. **Conclusion:** The present study found similar efficacy between 1% liquid polidocanol and 1% polidocanol foam in a macroscopic analysis. Microscopically, the foam group was the most effective, but revealed more adverse effects.

Keywords: Varicose Veins, Sclerotherapy, Sclerosing Solutions, Animal Models, Efficacy, Safety

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Veia dorsal marginal de coelho tratada com espuma em diferentes momentos.** A) antes da aplicação; B) 7 dias após a aplicação. Necrose e flebite; C) 14 dias após a aplicação. Necrose e flebite; D) 21 dias após a aplicação. Esclerose parcial da veia e perda de tecido da orelha.....29
- Figura 2. Veia dorsal marginal tratada com espuma em diferentes momentos.** A) antes da aplicação; B) 7 dias. Úlcera local e flebite. C) 14 dias. Úlcera e esclerose parcial. D) 21 dias. Esclerose parcial e úlcera em sítio de punção. Ausência de flebite.....29
- Figura 3. Veia dorsal marginal de coelho tratada com salina 21 dias após a aplicação, apresentando-se sem alterações macroscópicas (seta).....30**
- Figura 4. Veia dorsal marginal de coelho tratada com espuma 7 dias após a aplicação, apresentando flebite e processo inflamatório adjacente.....30**
- Figura 5. Veia dorsal marginal tratada com espuma em diferentes momentos.** A) antes da aplicação; B) 7 dias após a aplicação, apresentando flebite e inflamação; C) 14 dias após a aplicação, evidenciando flebite, inflamação e neovascularização; D) 21 dias após a aplicação apresentando esclerose parcial da veia, resolução da flebite e neovascularização.....31
- Figura 6. Veia dorsal marginal tratada com glicose em diferentes momentos.** A) antes da aplicação; B) 7 dias após a aplicação. Flebite. C) 14 dias após a aplicação. Recanalização. D) 21 dias após a aplicação.....31
- Figura 7. Frequência de achado de veia esclerosada em análise macroscópica na escleroterapia de veia marginal dorsal de coelho.** Valores expressos em números absolutos. Grupos contendo (*) apresentaram significância estatística com os demais grupos sem marcação, mas sem diferença estatística entre si, para cada achado especificado.....32
- Figura 8. Achados macroscópicos na escleroterapia de veia marginal dorsal de coelho.** PG: solução de polidocanol/glicose. Valores expressos em números absolutos. Grupos contendo (*) apresentaram significância estatística com os demais grupos sem marcação, mas sem diferença estatística entre si, para cada achado especificado.....33
- Figura 9. Veia dorsal marginal da orelha do coelho sem alterações (seta).** A) Elastica van Gieson, 40x. B) Elastica van Gieson, 100x.....34
- Figura 10. Hiperplasia intimal (seta).** Elastica van Gieson, 100x.....35

Figura 11.	Lúmen preenchido por tecido conectivo (esclerose) - seta. Elastica van Gieson, 100x35
Figura 12.	Lúmen preenchido por tecido conectivo (esclerose) - seta. Elastica van Gieson, 100x36
Figura 13.	Esclerose com recanalização (seta preta), mostrando lúmen preenchido parcialmente por tecido conectivo (seta branca). Elastica van Gieson, 100x.....36
Figura 14.	Destruição da parede do vaso (seta preta) e extravasamento de sangue (seta branca). Elastica van Gieson, 40x37
Figura 15.	Extravasamento de sangue (seta). Elastica van Gieson, 40x37
Figura 16.	Esclerose do vaso (seta preta) e neoangiogênese (seta branca). Elastica van Gieson, 400x38
Figura 17.	Esclerose parcial (seta branca), recanalização (seta preta) e congestão de hemácias (seta vermelha). Elastica van Gieson, 40x.....38
Figura 18.	Achados microscópicos na escleroterapia de veia marginal dorsal de coelho..... 39
Figura 19.	Veia dorsal marginal realçada pelos marcadores CD31 e CD34 (setas brancas). Imunohistoquímica43
Figura 20.	Neoangiogênese (setas brancas) destacada pelos marcadores CD31 e CD34. Imunohistoquímica.44
Figura 21.	Oclusão parcial da luz da veia dorsal marginal por trombo (seta branca). Imunohistoquímica (CD31 e CD34).44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Achados microscópicos na escleroterapia de veia dorsal marginal do coelho.....	40
Tabela 2	Comprimento da veia esclerosada medido com o auxílio do <i>software Image J</i> (Mediana, 1^o e 3^o quartis).....	42
Tabela 3	Correlação entre esclerose do vaso e efeitos adversos avaliados na macroscopia.....	42
Tabela 4	Correlação entre úlcera em sítio de punção e punção perivenular inadvertida	43

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	16
OBJETIVOS	20
MATERIAL E MÉTODOS	21
Tipo de estudo e animais	21
Critérios de inclusão	21
Critérios de exclusão	21
Local	21
Grupos e Randomização	21
Anestesia	23
Procedimentos técnicos	23
Técnica para escleroterapia	23
Desfechos	24
Análise estatística	25
RESULTADOS	27
Macroscopia	27
Microscopia	34
Análises pelo software Image J	41
Correlação entre achados macroscópicos	42
DISCUSSÃO	45
Discussão do método	45
Limitação do modelo	46
Discussão dos achados macroscópicos	47
Discussão dos achados microscópicos	49
CONCLUSÃO	52
REFERÊNCIAS	53
ANEXO	57
APÊNDICE	58

INTRODUÇÃO

Definem-se varizes como veias dilatadas e tortuosas, que apresentam perda de função valvular, com conseqüente refluxo e aumento de pressão no sistema venoso.[1, 2] São identificadas principalmente nos membros inferiores, podendo também ser localizadas nos membros superiores, pelve, plexo espermático, hemorroidário, esofágico, entre outros.[3] As varizes dos membros inferiores são importante motivo de procura por assistência médica especializada, devido a queixas clínicas e estéticas.[4] Nos pacientes com alterações venosas significativas nos membros inferiores, os sintomas de dor, queimação, edema, peso e câibras costumam estar presentes.[5]

As varizes são classificadas segundo a classificação CEAP. Essa classificação é baseada em sinais clínicos (C), etiologia (E), anatomia (A) e fisiopatologia (P). Clinicamente classifica-se como CEAP C0 (ausência de varizes), C1 (presença de telangiectasias e veias reticulares), C2 (presença de veias varicosas), C3 (presença de edema), C4 (alterações de pele), C5 (úlceras venosas cicatrizadas) e C6 (úlceras venosas ativas).[6]

A prevalência de veias varicosas evidentes (CEAP C2-6) varia de 5% a 15% nos homens e 3% a 29% nas mulheres.[7] Na cidade de Botucatu, São Paulo, observou-se prevalência de veias varicosas ou insuficiência venosa crônica de 47,6% em pacientes atendidos em um posto de saúde por outras queixas, sendo que 3,6% destes pacientes tinham úlcera ativa ou histórico de úlcera venosa já cicatrizada.[1] Nos Estados Unidos, estimou-se 20 a 25 milhões de pessoas com varizes nos membros inferiores, sendo 2,5 milhões com sinais e sintomas de insuficiência venosa crônica e 500.000 com úlceras de estase.[1] A maioria dos estudos revelou maior prevalência de varizes em mulheres.[5, 7, 8] Um achado comum nos estudos epidemiológicos é que esta prevalência aumenta com a idade, tanto em homens quanto em mulheres.[5, 7, 8] A prevalência de úlcera venosa ativa na população foi

estimada em 0,3%, ou seja, 1 em cada 350 adultos ou de 1% dos adultos, quando somada à população que já teve úlcera venosa cicatrizada.[8] Em serviço de referência em cirurgia vascular no Nordeste do Brasil, foram avaliados 154 pacientes com úlcera venosa ativa, revelando que 90% tinham baixo poder aquisitivo, 82% tinham o primeiro grau incompleto ou eram analfabetos e que o tempo médio de procura do paciente ao médico após o primeiro episódio da úlcera foi de 36 meses.[9] Estimou-se, em outro estudo, que foram perdidos cerca de seis milhões de dias de trabalho por ano devido a complicações relacionadas à insuficiência venosa crônica.[10]

As telangiectasias são veias que medem entre 0,1 e 1mm de diâmetro.[11] Nos membros inferiores, ocorrem em 29% a 41% das mulheres e 6% a 15% dos homens nos Estados Unidos[12] e representam uma manifestação inicial da doença venosa em membros inferiores.[4] Essa afecção pode se apresentar com dor, prurido e queimação, porém a maioria dos pacientes é assintomática e procura o tratamento primordialmente por questões estéticas.[13]

Atualmente, são utilizados o laser transdérmico e a escleroterapia para a eliminação das telangiectasias. O laser consiste em modalidade não invasiva de tratamento que provoca lesão ao vaso com o uso da luz pulsada.[13, 14] A escleroterapia consiste na aplicação local intravascular de substância que promove lesão endotelial e consequente oclusão do vaso.[11]

Os esclerosantes induzem a formação de um trombo local, que evolui para a formação de um cordão fibroso, processo este denominado de esclerose. O evento trombótico venoso tem como fatores cardeais a estase venosa, a hipercoagulabilidade e a lesão endotelial, que formam a tríade de Virchow.[15] O objetivo da escleroterapia é, pois, a exclusão de fluxo sanguíneo definitivo no vaso tratado, por meio de um dos pilares desta tríade: a lesão endotelial.[16-20] Esse procedimento proporciona melhora clínica, com desaparecimento de cerca de 80% das telangiectasias da área tratada. Entretanto, os agentes esclerosantes podem

provocar complicações locorregionais ou sistêmica, variando desde hiperpigmentação cutânea, necrose tecidual, formação de úlceras até reação anafilática e alterações neurológicas. [18, 20-22]

Apesar de mais de um século de uso de escleroterápicos, o esclerosante ideal, ou seja, aquele com total eficácia e ausência de complicações[18, 23], ainda não foi descoberto.[18] Há variados esclerosantes utilizados na prática médica com diferentes tipos de ação para a eliminação de telangiectasias, veias reticulares e varicosidades. Todavia, estudos comparando eficácia e segurança destes mostram resultados variáveis[18] e carecem de evidências científicas proporcionadas por estudos randomizados e controlados.

Os esclerosantes podem lesar o endotélio do vaso por uma ação detergente, osmótica ou química na parede vascular.[14, 18] Os esclerosantes detergentes, como o polidocanol, o tetradecil sulfato de sódio, o oleato de monoetanolamina e o morruato de sódio produzem dano ao endotélio por meio de múltiplos mecanismos, associados à interferência nos lipídios da membrana celular, divisão do cimento intercelular e desnaturação de proteínas.[18, 24-26] Mais recentemente, o polidocanol e o tetradecil sulfato de sódio têm sido utilizados em forma de espuma, combinados com o ar ambiente[27] ou outros gases.[28-30] A espuma aumenta a potência da substância de 2 a 4 vezes, ao deslocar o sangue mecanicamente e ficar em contato com endotélio por mais tempo e em uma área maior.[18, 27] Alguns autores recomendam o uso de dióxido de carbono[28, 29] ou gás fisiológico[30] alegando redução dos efeitos adversos locais e aumento da eficácia do esclerosante.[30] Outros obtiveram significativamente menor taxa de complicações sistêmicas (aperto no peito, tosse seca, tontura, entre outros) com o uso do gás carbônico.[29]

Os esclerosantes com ação hiperosmótica agem promovendo a desidratação das células do endotélio e das hemácias, além de causar desnaturação das proteínas da superfície celular, acarretando a destruição e a desintegração dessa porção da parede venosa. Sua

principal vantagem consiste na baixa alergenicidade, porém sua injeção costuma provocar irritação das terminações nervosas e ser dolorosa.[26] São representados pela salina hipertônica e glicose hipertônica.

As soluções químicas irritantes, também conhecidas como corrosivas ou toxinas celulares, dissolvem o cimento intercelular e provocam endofibrose. São representadas pelo iodo-poli-iodado, salicilato de sódio e glicerina.[26]

Estudos clínicos randomizados comparativos controlados sobre escleroterapia de telangiectasias e veias reticulares (CEAP C1), com critérios de inclusão e exclusão bem estabelecidos e amostra homogênea, são escassos.[4, 23, 31-34] A avaliação da efetividade e segurança terapêutica costuma ser precedida por estudos em modelos experimentais pré-clínicos. O modelo da orelha de coelho é um dos modelos mais estudados.[11, 13, 14, 35-41] Tal fato deve-se à semelhança da veia dorsal marginal da orelha do coelho com telangiectasias, apresentando-se como vasos superficiais e de pequeno calibre.[13, 14, 35-41]

OBJETIVOS

O presente estudo tem por objetivo avaliar a eficácia e segurança de agentes esclerosantes infundidos na veia dorsal marginal da orelha de coelhos por meio de análise macroscópica, histológica e imuno-histoquímica.

MATERIAL E MÉTODOS

Ética

A pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Botucatu – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FMB-UNESP), sob o número CEUA 1007/2013.

Tipo de estudo e animais

Foi realizado um estudo experimental randomizado aberto em orelhas coelhos normais.

Crítérios de inclusão

Foram incluídos 30 coelhos da raça *Norfolk*, procedentes do biotério da FMB, com cerca de 2-4kg de peso corporal, em boas condições clínicas e com orelhas íntegras, sendo descartados os animais que apresentavam alguma doença previamente identificada, orelhas imperfeitas ou com alterações em suas veias auriculares ou usados previamente em outros estudos.

Local

O estudo foi realizado no Laboratório de Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia e Ortopedia da Faculdade de Medicina de Botucatu – FMB-UNESP. A análise histológica foi realizada no Laboratório de Histologia da FMB-UNESP e no laboratório Histopathologie und VascPath, em Berna, Suíça.

Grupos e Randomização

A veia dorsal marginal de cada orelha foi utilizada para o tratamento escleroterápico, sendo que foi procedida apenas uma única infusão do esclerosante de acordo com a randomização previamente realizada. As orelhas foram randomizadas em 5 grupos e os animais foram, então, identificados por numeração com caneta de marcação permanente na região dorsal e reforçada em cada avaliação.

Os grupos foram constituídos ao acaso, utilizando números randomizados sorteados por computador. A randomização foi feita por meio de lista gerada automaticamente pelo *software Epi-Info 7*, discriminando a alocação dos grupos com numeração consecutiva das orelhas a serem tratadas, totalizando 60 orelhas. Como a aleatorização foi feita por orelha, um mesmo coelho pode ter recebido dois esclerosantes diferentes. As orelhas foram, assim, divididas em 5 grupos:

1. Grupo Controle (n=12 orelhas): administrado 0,25ml de soro fisiológico 0,9%;
2. Grupo Glicose (n=12 orelhas): administrado 0,25ml de Glicose hipertônica a 75%;
3. Grupo Polidocanol (n=12 orelhas): administrado 0,25ml de Polidocanol a 1%;
4. Grupo Polidocanol/Glicose (PG) (n=12 orelhas): administrado 0,25ml de solução de Polidocanol a 0,2% associado a Glicose 70%;
5. Grupo Espuma (n=12 orelhas): administrado 0,25ml de Polidocanol a 1% em forma de microespuma.

A orelha esquerda do 29º coelho havia sido randomizada para ser tratada com o esclerosante PG, porém foi erroneamente administrado pelo pesquisador o esclerosante de

polidocanol a 1% em forma de espuma. Dessa forma, o grupo PG teve um n de 11 orelhas, enquanto o grupo espuma teve um n de 13 orelhas.

Anestesia

Os coelhos foram anestesiados com xilazina (2-5 mg/kg, via intramuscular). Logo após, realizou-se a tricotomia das orelhas com tosador de pelos elétrico e a antissepsia com solução de clorhexidina alcoólica a 0,5%.

Procedimentos técnicos

Para o preparo da espuma, utilizou-se a técnica descrita por Tessari e cols.[27], que consiste na utilização de duas seringas descartáveis, sendo a primeira seringa de três mililitros contendo 0,5ml de polidocanol, e a segunda de 3ml contendo 2ml de ar ambiente. As duas seringas foram conectadas entre si por meio de torneira de 3 vias, misturando-se o ar de uma seringa com o conteúdo líquido da outra. Por meio de movimentos sincronizados e repetitivos, pressionaram-se os êmbolos das seringas alternadamente e vigorosamente, levando o conteúdo de uma seringa para a outra por cerca de 20 vezes, com formação de espuma.[27]

Para os demais grupos, utilizaram-se ampolas com preparação comercial prontas com glicose 75%, polidocanol 1%, soro fisiológico 0,9% e polidocanol a 0,2% diluído em glicose a 70%.

Técnica para escleroterapia

Procedeu-se punção da veia marginal com agulha *Terumo*[®] 30G, injetando-se lentamente o esclerosante, a fim de que o mesmo se propagasse homoganeamente por toda extensão da veia marginal na orelha em um volume máximo de 0,25ml.[41] Em todos os

grupos foi feita compressão manual local do sítio de punção e de toda extensão venosa por 90 segundos, propiciando maior contato da substância esclerosante com o endotélio da veia. Realizou-se, em seguida, um curativo com *micropore*[®] no local da punção. Todas as seringas dos diversos grupos foram preparadas e administradas pelo investigador principal.

Desfechos

Análise Fotográfica

Foram realizadas fotografias das orelhas dos animais antes da injeção do esclerosante e após 7, 14 e 21 dias da sessão de escleroterapia. A análise das fotografias foi feita por cirurgião vascular sem conhecimento dos grupos do estudo. A eficácia do esclerosante foi avaliada pelos parâmetros: 1) ausência de esclerose, 2) esclerose parcial e 3) esclerose total. A segurança do escleroterápico foi avaliada pela presença de complicações locais: 1) inflamação, 2) hiperpigmentação, 3) necrose, 4) ulceração e 5) neovascularização e 6) flebite (precoce e tardia). Foi definido como flebite precoce aquela presente na avaliação fotográfica do 7º dia do tratamento e flebite tardia aquela que ainda estava presente no 21º dia do tratamento. Foi usado o *software Image J* para medir a extensão e o diâmetro da veia tratada. Considerou-se o comprimento final da veia dorsal marginal da orelha do coelho igual ao comprimento inicial naqueles vasos em que não se detectou esclerose à análise macroscópica. Os vasos em que se detectaram esclerose (parcial ou total) foram inseridos no programa *Image J*, sendo aferidos o comprimento inicial e o comprimento no 21º dia. Calculou-se, então, por meio da diferença de comprimentos (inicial e final), o comprimento de veia esclerosada.

Análise Histológica

Para o exame microscópico, foi realizado uma biópsia em cada da orelha em sua porção média, longe do sítio de punção, no 21º dia do tratamento. Os espécimes foram fixados em formol neutro a 10% e depois emblocados em parafina. Cortes transversais foram corados por meio de Hematoxilina-Eosina no Laboratório de morfologia do Instituto de Biociências de Botucatu. No laboratório VascPath (Suíça), os cortes foram corados com Elastica van Gieson e se utilizaram os marcadores CD31 e CD34 para análise imuno-histoquímica. A análise imuno-histoquímica teve papel fundamental na interpretação do resultado das lâminas, por serem marcadores de endotélio. As lâminas foram avaliadas por patologista vascular, sem conhecimento prévio dos grupos, no laboratório VascPath.

Um microscópio óptico Olympus BX45 (magnificação de 12,5 a 400x) foi utilizado para análise microscópica. As micrografias foram realizadas com a câmera Canon.

Análise estatística

O tamanho da amostra foi baseado na eficácia de 100% do polidocanol líquido a 1% em esclerose de veia dorsal marginal do coelho[41], em comparação com 54% de eficácia da glicose hipertônica.[42] O poder do teste foi arbitrado em 80% e o nível de significância em 5%, determinando 11 orelhas por grupo.[43]

Coletaram-se os dados em planilha eletrônica de forma padronizada. Utilizou-se o teste exato de *Fisher* para comparação das proporções e Risco Relativo (RR) com intervalo de confiança (IC) de 95%.

Para comparar os resultados da análise macroscópica, foi realizado o teste do qui-quadrado e, como houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, utilizou-se o teste de Goodman para mostrar as diferenças. Calculou-se o número necessário para tratar (NNT) e o *number needed to harm* (NNH), respectivamente para eficácia e efeitos adversos, no grupo em que houve diferença estatística comparado ao grupo controle.

Para avaliar quantitativamente a mudança de comprimento e diâmetro da veia após a esclerose, foi realizado o teste de Kruskal-Wallis, uma vez que as variáveis não apresentaram distribuição normal e/ou homogeneidade de variâncias. Sendo assim, os resultados foram apresentados por meio de medianas e quartis.

Para cálculo de correlação entre achados macroscópicos foi utilizados o coeficiente de correlação de Spearman.

RESULTADOS

Macroscopia

a) Eficácia

Na avaliação macroscópica comparativa entre as fotografias obtidas pré-tratamento e após 21 dias do tratamento, observou-se a presença de esclerose parcial da veia dorsal marginal de coelho em 10/13 (76,9%) orelhas no grupo tratado com espuma. Esse dado mostrou superioridade estatística em relação aos demais grupos ($p < 0,001$), exceto o grupo tratado com polidocanol na forma líquida a 1% (4/12 casos – 33,3%). O grupo glicose somou 3 casos (25%) de esclerose, sendo inferior estatisticamente ao grupo espuma e semelhante aos demais grupos. Em nenhum dos casos houve esclerose de toda a extensão da veia (Figuras 1 e 2). Não foi detectado nenhum caso de esclerose nos grupos PG e controle (Figura 3).

O NNT para esclerose quando comparada com o controle foi 2, significando que a cada 2 orelhas tratadas com espuma, uma teve esclerose.

b) Segurança

Na avaliação macroscópica comparativa entre as fotografias obtidas pré-tratamento e após 21 dias do tratamento, o grupo espuma apresentou maior número de complicações macroscópicas, com quatro casos (30,7%, $p = 0,003$) de necrose (Figura 1), seis casos (46,15%, $p = 0,003$) de úlcera (Figura 2) e nove casos (69,2%, $p < 0,0001$) de processo inflamatório (Figuras 4 e 5), resultados estes com significância estatística quando comparados aos demais grupos. Houve sete casos (53,8%) de neovascularização (Figura 5) no grupo espuma, três casos no grupo polidocanol (25%) e três no grupo glicose (25%). Quanto a este parâmetro, o grupo espuma mostrou superioridade quando comparado aos grupos controle e PG ($p = 0,007$), porém sem diferença em relação aos grupos polidocanol e glicose.

Sete dias após a infusão do escleroterápico, a presença de flebite precoce (Figuras 1, 2, 4, 5 e 6) ocorreu em 76,9% no grupo espuma, seguido do grupo polidocanol (41,7%) e glicose (33,3%). No 21º dia, a presença de segmentos de veia apresentando flebites mais tardias se manteve em 5 casos no grupo espuma e em um caso no grupo glicose. A Figura 6 exemplifica um caso de flebite em uma veia na qual foi injetada glicose a 75%, evoluindo com recanalização. Os achados macroscópicos estão representados nas Figuras 7 e 8.

O NNH para flebite precoce, flebite tardia, necrose, úlcera e processo inflamatório do grupo espuma, quando comparado com o controle, foi 2, 3, 4 e 2, respectivamente.

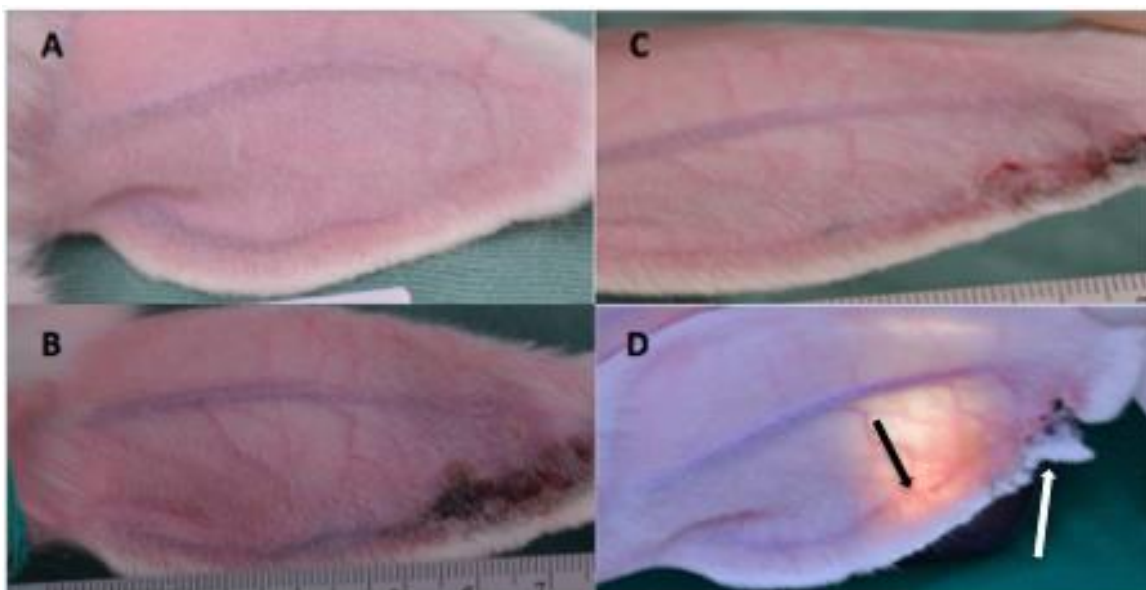


Figura 1 - Veia dorsal marginal de coelho tratada com espuma em diferentes momentos. A) antes da aplicação; B) 7 dias após a aplicação. Necrose e flebite; C) 14 dias após a aplicação. Necrose e flebite; D) 21 dias após a aplicação. Esclerose parcial da veia (seta preta) e perda de tecido da orelha (seta branca)

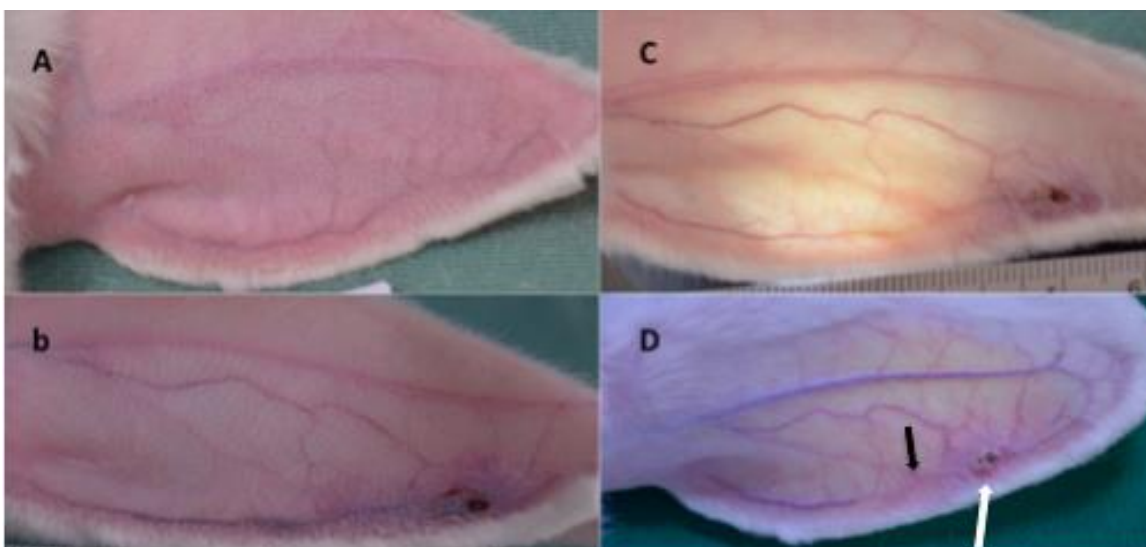


Figura 2 - Veia dorsal marginal tratada com espuma em diferentes momentos. A) antes da aplicação; B) 7 dias. Úlcera local e flebite. C) 14 dias. Úlcera e esclerose parcial. D) 21 dias. Esclerose parcial e úlcera em sítio de punção. Ausência de flebite



Figura 3 - Veia dorsal marginal de coelho tratada com salina 21 dias após a aplicação, apresentando-se sem alterações macroscópicas (seta).



Figura 4 - Veia dorsal marginal de coelho tratada com espuma 7 dias após a aplicação, apresentando flebite e processo inflamatório adjacente.

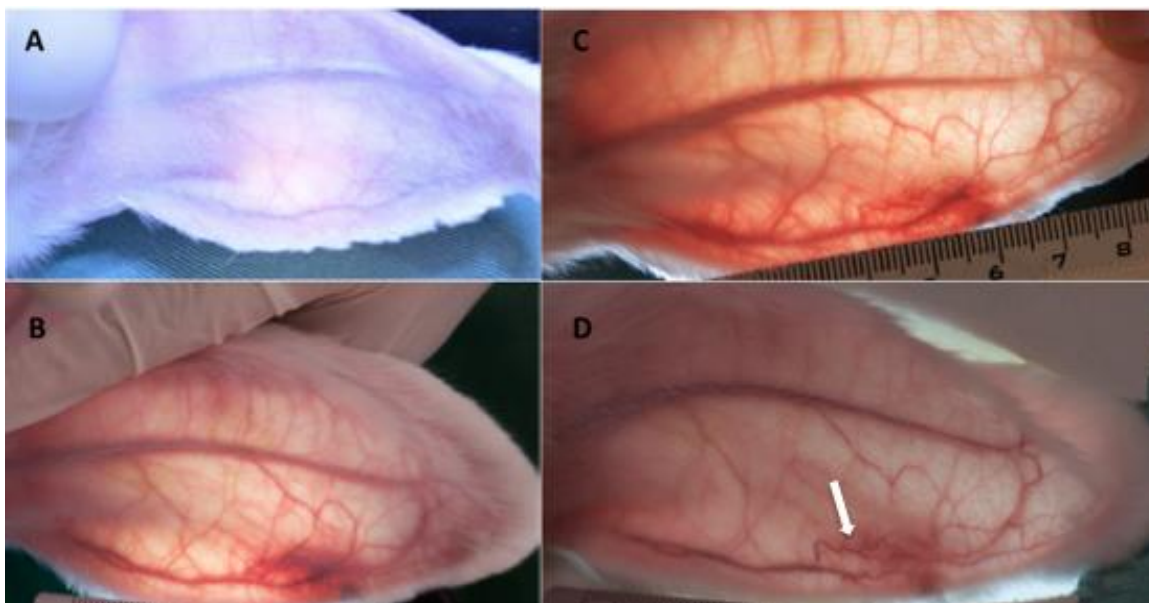


Figura 5 - Veia dorsal marginal tratada com espuma em diferentes momentos.

A) antes da aplicação; B) 7 dias após a aplicação, apresentando flebite e inflamação; C) 14 dias após a aplicação, evidenciando flebite, inflamação e neovascularização; D) 21 dias após a aplicação apresentando esclerose parcial da veia, resolução da flebite e neovascularização (seta branca)

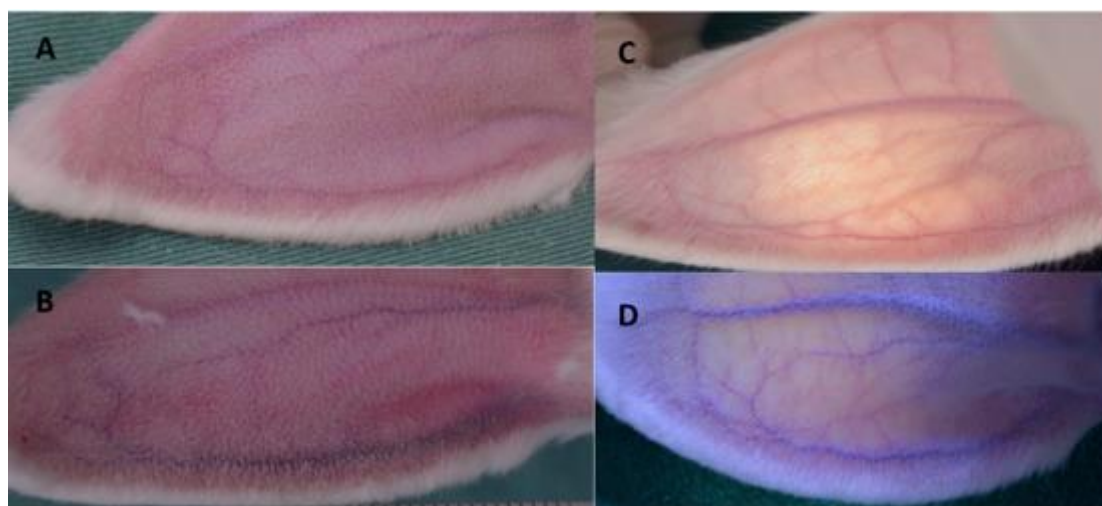


Figura 6 - Veia dorsal marginal tratada com glicose em diferentes momentos.

A) antes da aplicação; B) 7 dias após a aplicação. Flebite. C) 14 dias após a aplicação. D) 21 dias após a aplicação. Recanalização

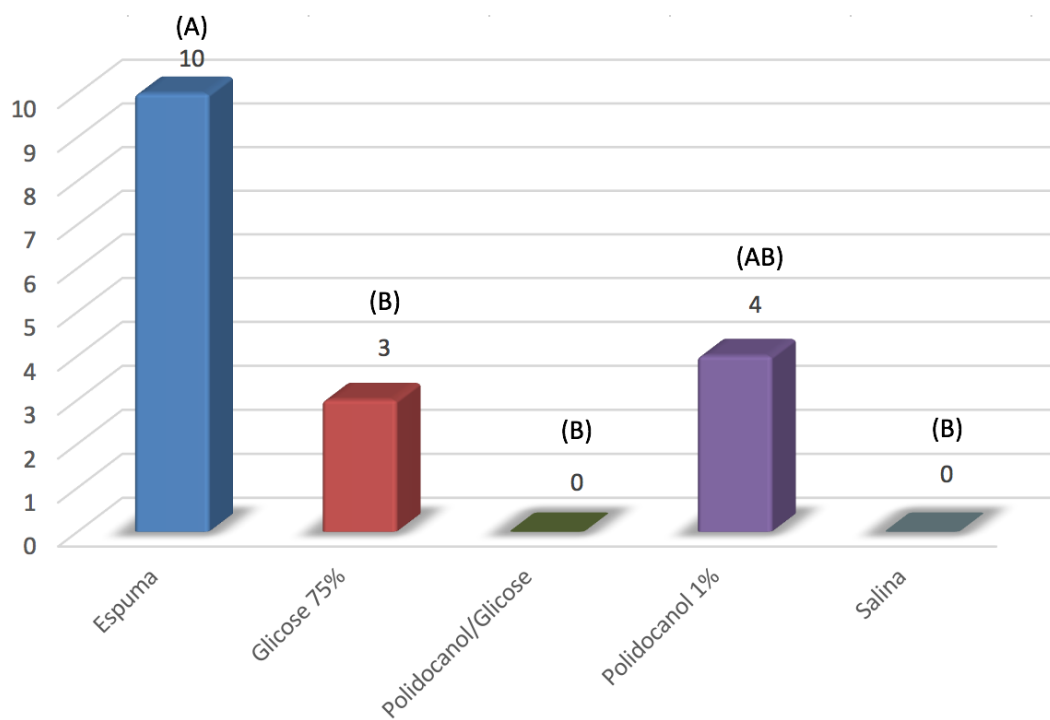


Figura 7 – Frequência de veia esclerosada parcialmente em análise macroscópica na escleroterapia de veia marginal dorsal de coelho

$p < 0,001$

Valores expressos em números absolutos. Grupos seguidos de pelo menos uma letra (A ou B) em comum não diferiram estatisticamente entre si.

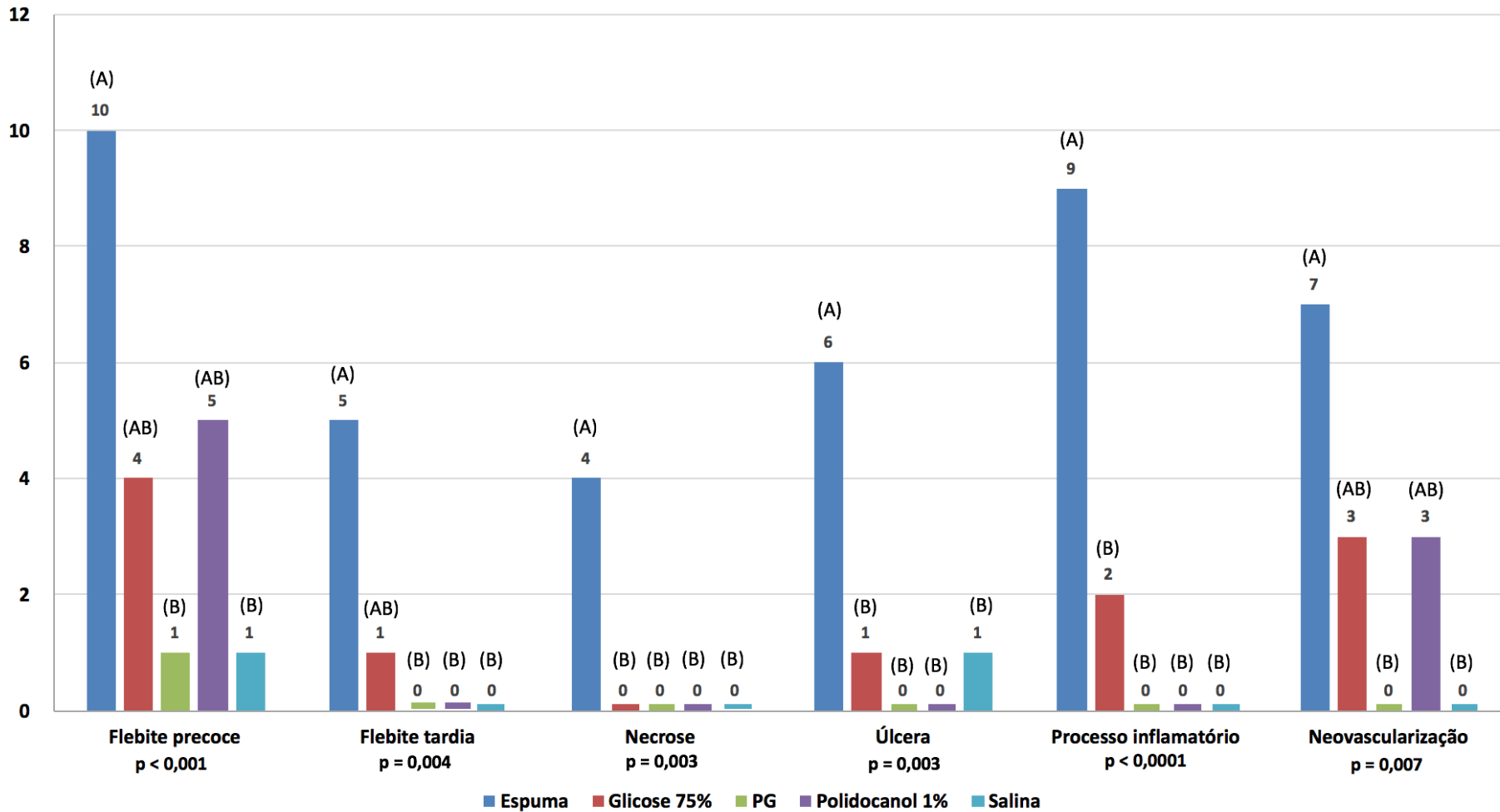


Figura 8 – Achados macroscópicos na escleroterapia de veia marginal dorsal de coelho

PG: solução de polidocanol/glicose. Valores expressos em números absolutos. Grupos seguidos de pelo menos uma letra (A ou B) em comum não diferiram estatisticamente entre si.

Microscopia

a) Eficácia

Os principais achados microscópicos estão representados nas figuras 9 a 17.

Microscopicamente, observou-se presença de esclerose da veia marginal dorsal da orelha do coelho em 9 de 13 orelhas (69,2%) tratadas com espuma (Tabela 1), mostrando-se significativa ($p=0,0024$) em relação aos demais grupos estudados (Figura 18).

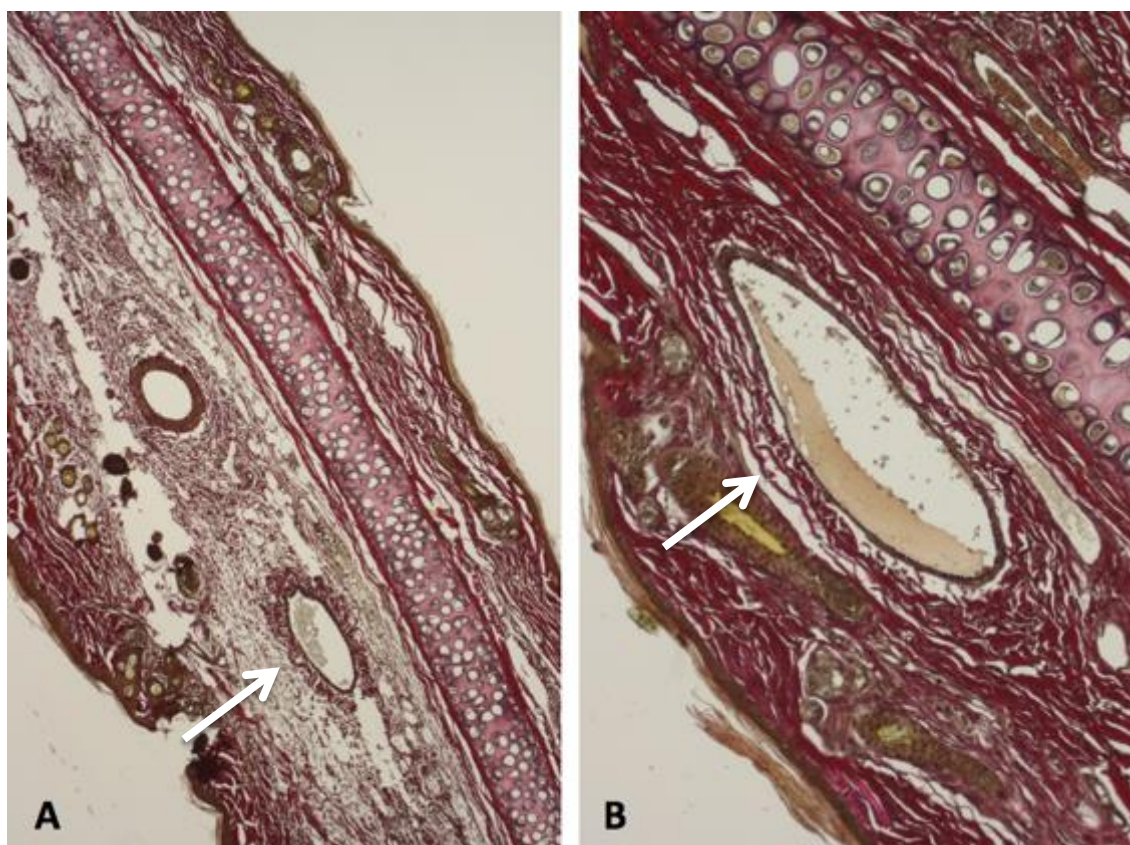


Figura 9 - Veia dorsal marginal da orelha do coelho sem alterações (seta). A) Elastica van Gieson, 40x. B) Elastica van Gieson, 100x.

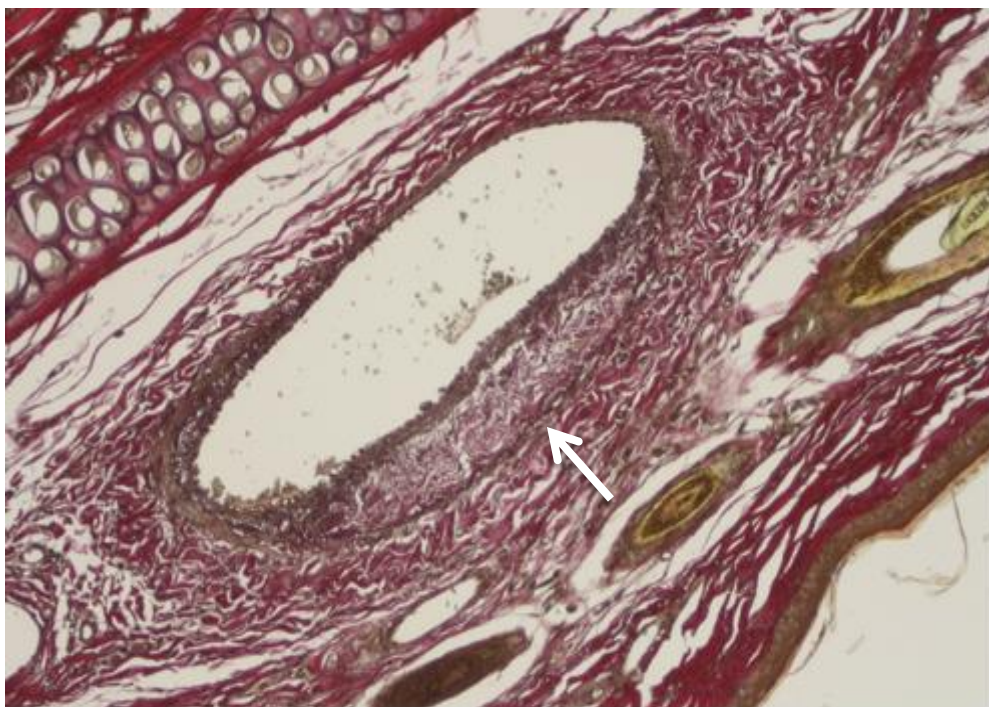


Figura 10 - Hiperplasia intimal (seta). Elastica van Gieson, 100x.

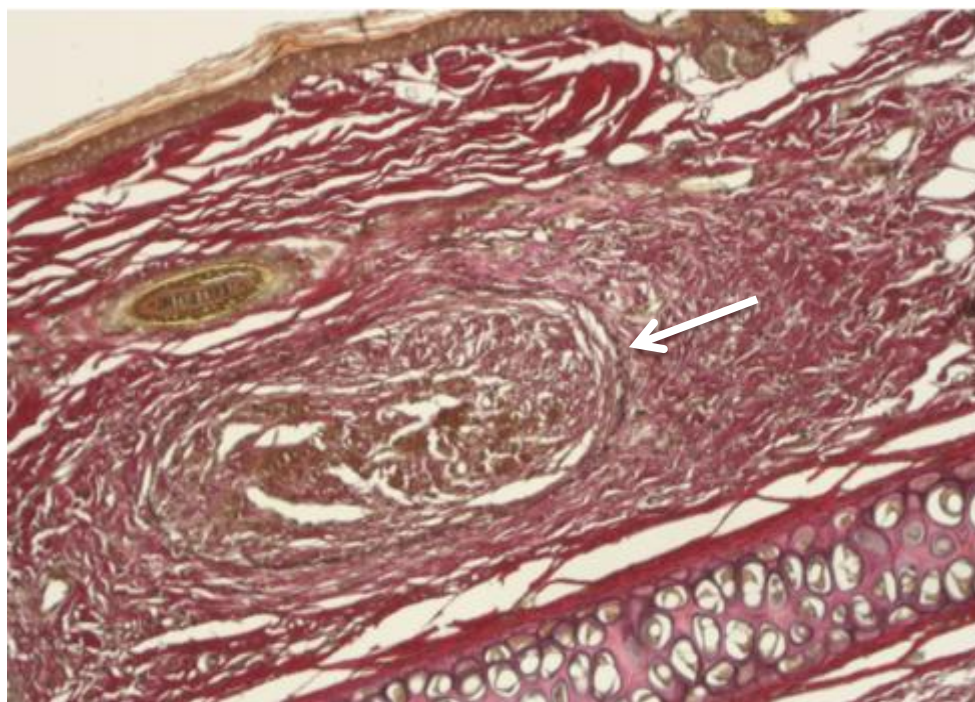


Figura 11 – Lúmen preenchido por tecido conectivo (esclerose) - seta.
Elastica van Gieson, 100x

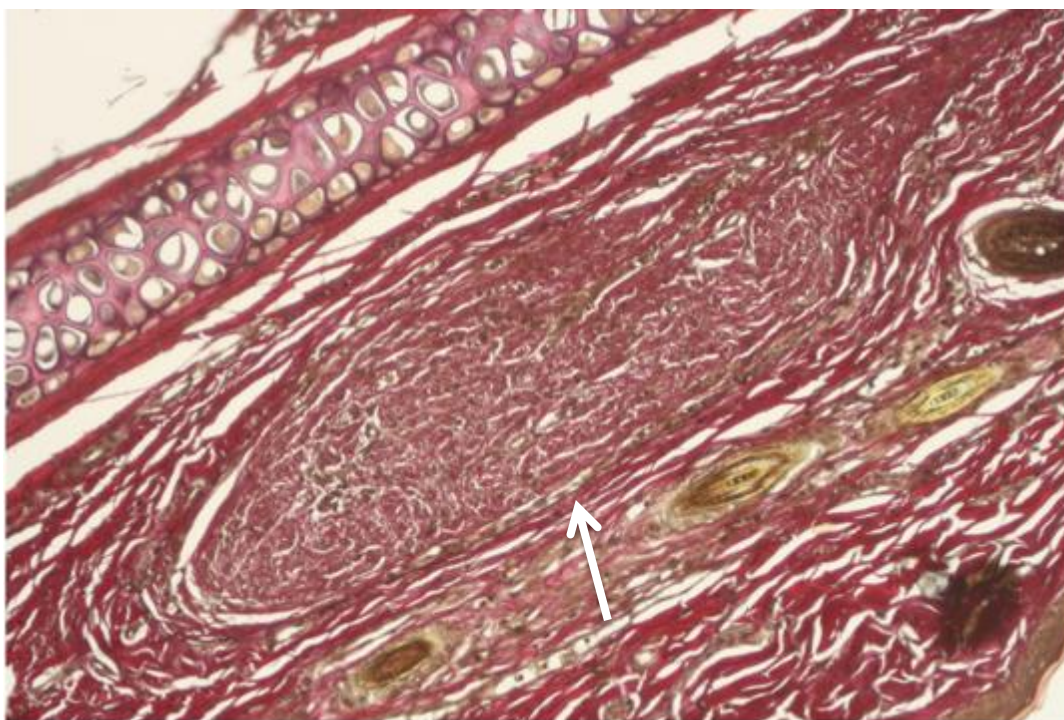


Figura 12 - Lúmen preenchido por tecido conectivo (esclerose) - seta. Elastica van Gieson, 100x

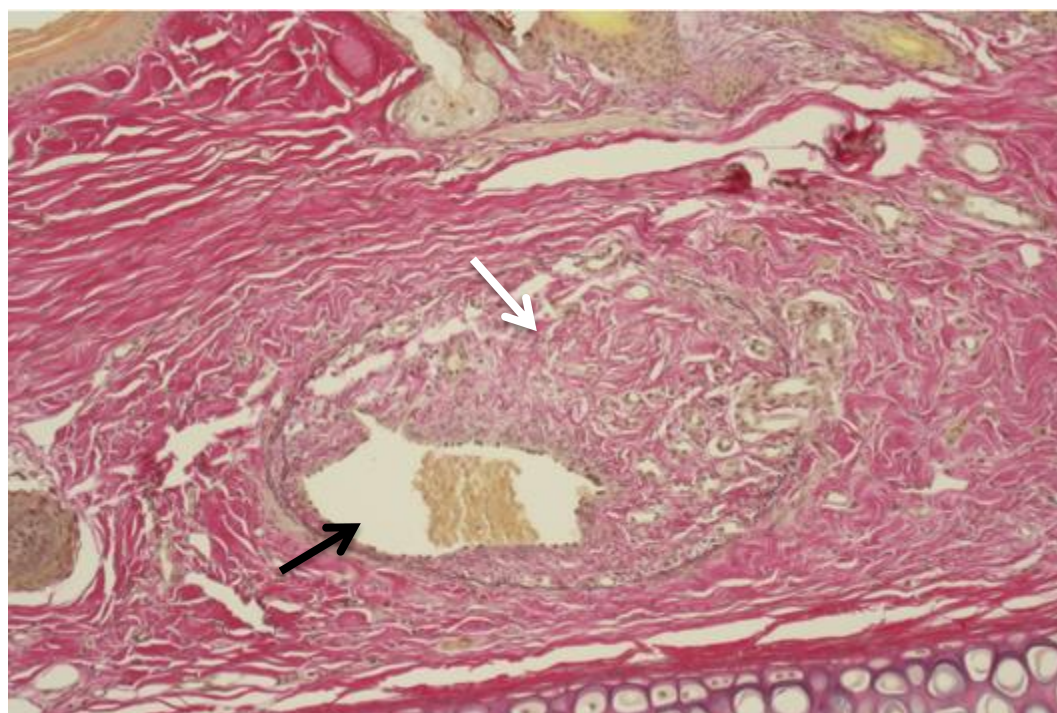


Figura 13 - Esclerose com recanalização (seta preta), mostrando lúmen preenchido parcialmente por tecido conectivo (seta branca). Elastica van Gieson, 100x

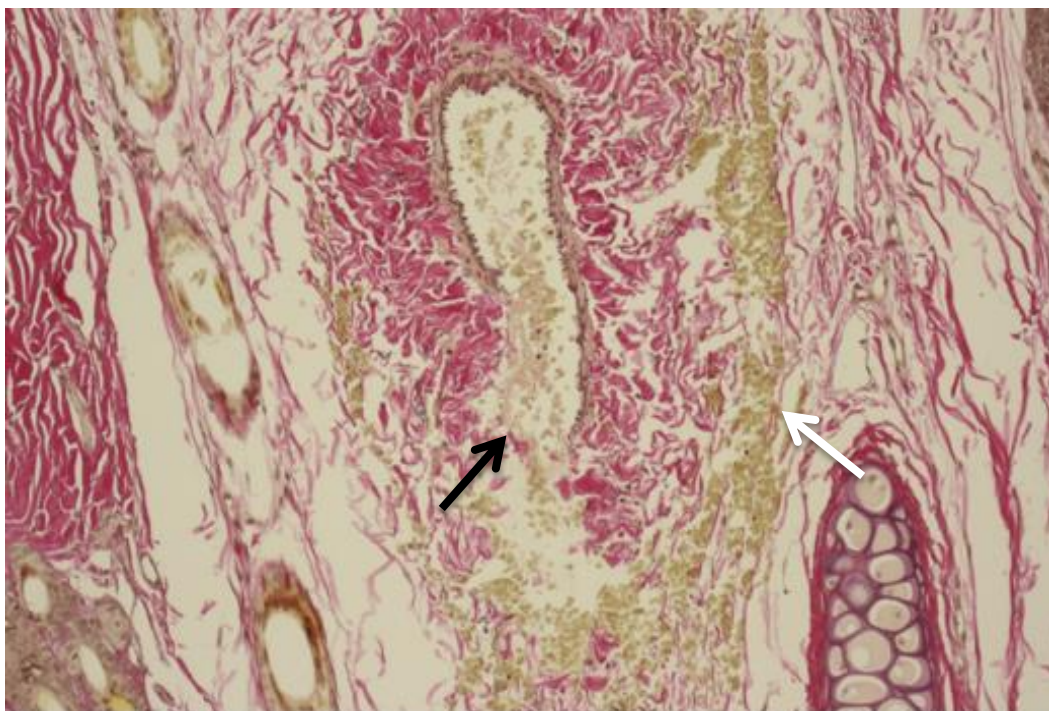


Figura 14 - Destrução da parede do vaso (seta preta) e extravasamento de sangue (seta branca). Elastica van Gieson, 40x

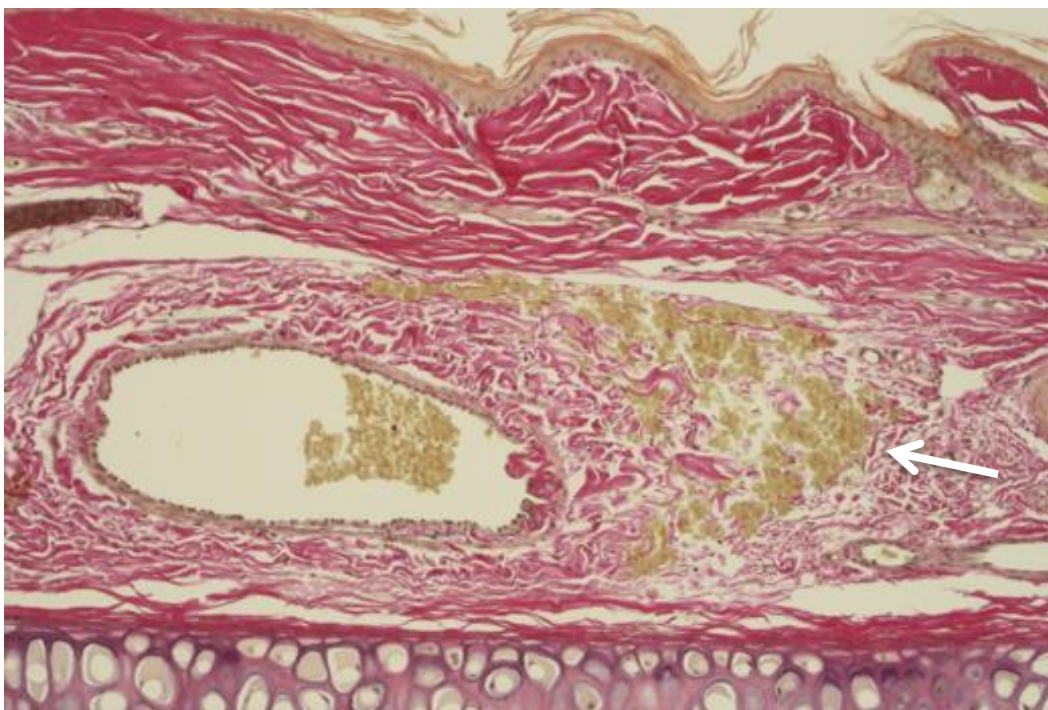


Figura 15 - Extravasamento de sangue (seta). Elastica van Gieson, 40x

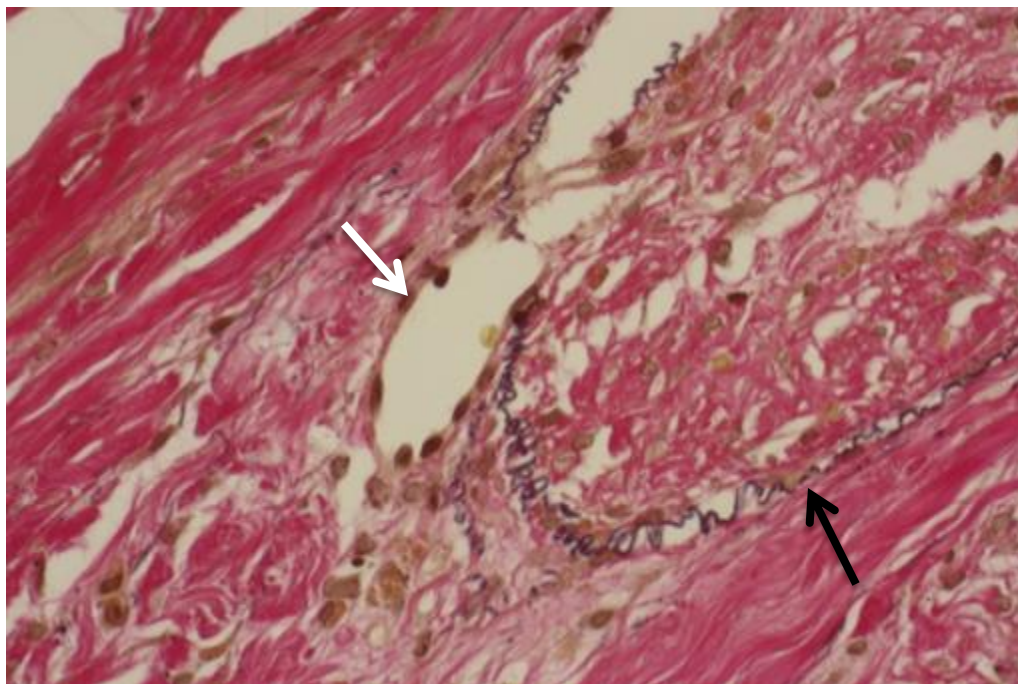


Figura 16 - Esclerose do vaso (seta preta) e neoangiogênese (seta branca).
Elastica van Gieson, 400x

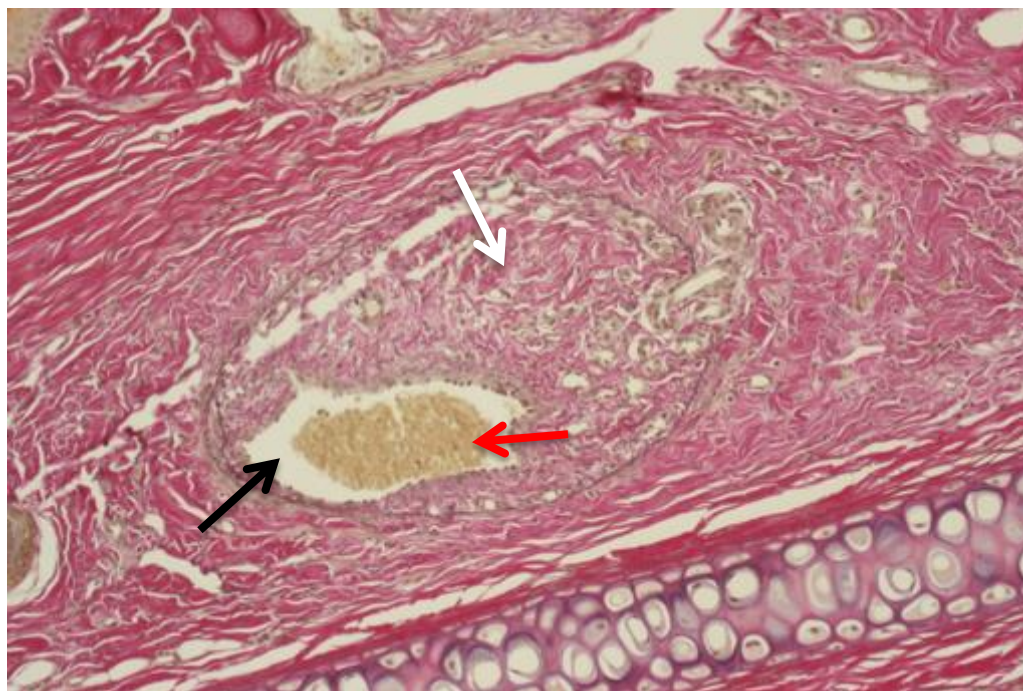


Figura 17 - Esclerose parcial (seta branca), recanalização (seta preta) e congestão de hemácias (seta vermelha).
Elastica van Gieson, 40x.

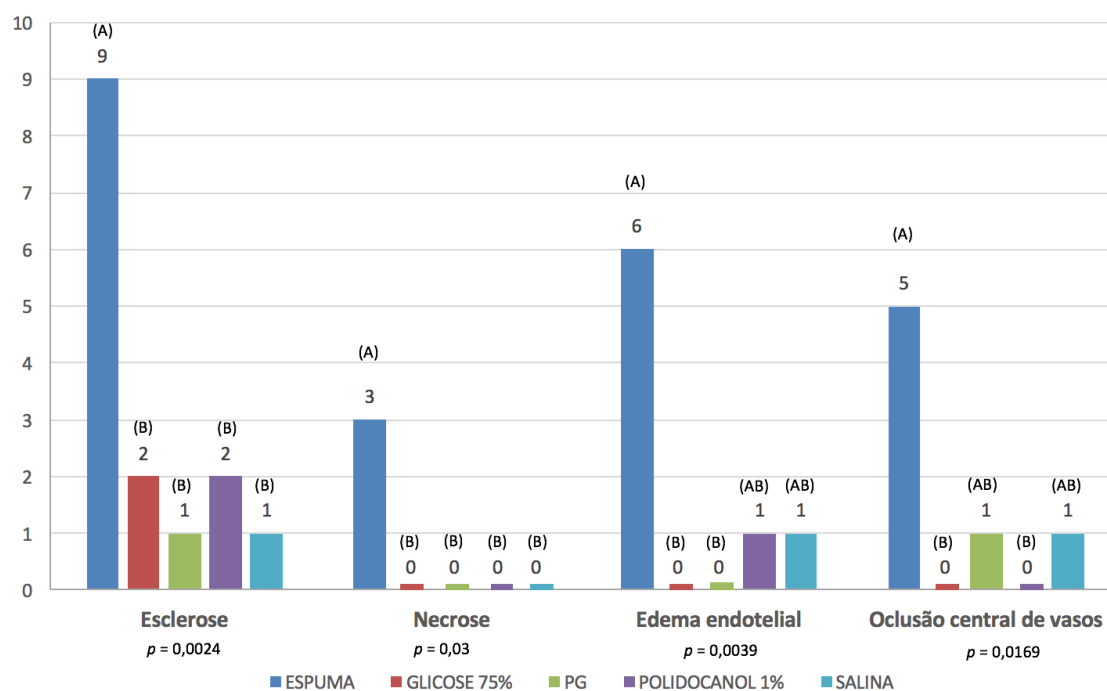


Figura 18 – Achados microscópicos na escleroterapia de veia marginal dorsal de coelho

PG: solução de polidocanol/glicose. Valores expressos em números absolutos. Grupos seguidos de pelo menos uma letra (A ou B) em comum não diferiram estatisticamente entre si.

Tabela 1 – Achados microscópicos na escleroterapia de veia dorsal marginal do coelho

Grupo	N	Trombose n (%)	Necrose n (%)	Edema endotelial n (%)	Oclusão central de vasos n (%)	Vasodilatação n (%)	Extravasamento de sangue n (%)	Edema da túnica média n (%)	Células fagocíticas com hemossiderina n (%)	Células inflamatórias periféricas n (%)	Neoangio- gênese n (%)	Linfangio- gênese n (%)	Pré- trombose n (%)	Trombose recanalizada n (%)	Ectasia n (%)	Destruição de cartilagem n (%)
Espuma	13	9 (69,2%) A	3 (23,1%) A	6 (46,2%) A	5 (38,5) A	1 (7,7%) B	3 (23,1%)	2 (15,4%)	3 (23,1%)	7 (53,9%)	1 (7,7%)	1 (7,7%)	1 (7,7%)	2 (15,4%)	0	1 (7,7%)
Glicose	12	2 (16,7%) B	0 B	0 B	0 B	1 (8,3%) B	6 (50%)	2 (16,7%)	2 (16,7%)	5 (41,7%)	1 (8,3%)	1 (8,3%)	1 (8,3%)	0	1 (8,3%)	0
PG	11	1 (9,1%) B	0 B	0 B	1 (9,1%) AB	6 (56,4%) A	6 (54,6%)	0	3 (23,1%)	4 (36,4%)	0	2 (18,2%)	5 (45,5%)	0	1 (9,1%)	2 (18,2%)
Polidocanol	12	2 (16,7%) B	0 B	1 (8,3%) AB	0 B	1 (8,3%) B	7 (58,3%)	2 (16,7%)	2 (16,7%)	5 (41,7%)	2 (16,7%)	1 (8,3%)	3 (25%)	0	0	0
Controle	12	1 (8,3%) B	0 B	1 (8,3%) AB	1 (8,3%) AB	5 (41,7%) AB	9 (75%)	2 (16,7%)	4 (36,4%)	3 (33,3%)	0	1 (8,3%)	2 (16,7)	0	0	1 (8,3%)
Total	60	15 (25%)	3 (5%)	8 (13,3%)	7 (11,7%)	14 (23,3%)	31 (51,7%)	8 (13,3%)	14 (23,3%)	25 (41,7%)	4 (6,7%)	6 (10%)	12 (20%)	2 (3,3%)	2 (3,3%)	4 (6,7%)
Valor de p		0,0024	0,03	0,0039	0,0169	0,012	0,13	0,68	0,49	0,87	0,72	0,89	0,18	0,19	0,41	0,3

Legenda: PG: solução de polidocanol / Glicose. Grupos seguidos de pelo menos uma letra (A ou B) em comum não diferiram estatisticamente entre si; valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

b) Segurança

A presença de necrose de epiderme foi notada apenas no grupo espuma (3 casos), o que foi também estatisticamente significativo ($p=0,03$) (Tabela 1). Não houve diferença entre os grupos estudados quanto à presença de extravasamento de sangue, edema da túnica média, presença de células fagocíticas com pigmento de hemossiderina e de células inflamatórias periféricas, neoangiogênese, linfangiogênese e destruição de cartilagem (Tabela 1).

Não foi identificado edema endotelial nos grupos Glicose e PG (Tabela 1). A presença de oclusão central de vasos foi mais frequente no grupo espuma (5 casos). (Tabela 1).

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos quanto à presença de trombose com recanalização (Tabela 1).

Os grupos PG e controle apresentaram maior frequência casos de vasodilatação quando comparados aos demais (Tabela 1).

Análise imunohistoquímica

A análise imunohistoquímica com marcadores CD31 e CD34 foi qualitativa e teve papel fundamental para a interpretação dos achados microscópicos representados na Tabela 1, principalmente no quesito neoangiogênese. (Figuras 19, 20 e 21)

Análise pelo software *Image J*

A análise estatística mostrou equivalência entre os grupos espuma, polidocanol e glicose quando se comparou o comprimento de veia esclerosada aferida por meio deste *software*. Os valores destes grupos foram também estatisticamente superiores aos dos grupos controle e PG (Tabela 2).

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos em relação ao diâmetro inicial e final da veia dorsal marginal do coelho.

Correlação entre achados macroscópicos

Houve correlação positiva ($p < 0,0001$) entre esclerose do vaso e a presença de neovascularização, processo inflamatório e flebite precoce (Tabela 3).

Houve necessidade de uma segunda punção para infundir o escleroterápico devido a punção perivenular inadvertida em 8 casos de um total de 60 orelhas. Esse fato não mostrou correlação ($p = 0,94$) com a presença de úlcera no sitio de punção (Tabela 4).

Tabela 2 - Comprimento da veia esclerosada medido com o auxílio do *software Image J* (Mediana, 1º e 3º quartis)

Grupo	Mediana	1º quartil	3º quartil
PG	0 B	0	0
Espuma	2,9 A	1,3	3,9
Polidocanol	0 AB	0	0,6
Controle	0 B	0	0
Glicose	0 AB	0	0,1

$p < 0,001$

PG: solução de polidocanol/glicose. Grupos seguidos de pelo menos uma letra em comum não diferiram estatisticamente entre si.

Tabela 3 – Correlação entre esclerose do vaso e efeitos adversos avaliados na macroscopia

Esclerose	Flebite precoce		Inflamação		Neovascularização		Total
	Presente	Ausente	Presente	Ausente	Presente	Ausente	
Presente	13	5	11	7	12	6	18
Ausente	8	34	0	42	1	41	42
Total	21	39	11	49	13	47	60
Valor de p	<0,0001		<0,0001		<0,0001		
Valor de R	0,51		0,72		0,71		
Valores coincidentes	78%		88%		88%		

Valores apresentados em números absolutos e porcentagem.

Tabela 4 – Correlação entre úlcera em sítio de punção e punção perivenular inadvertida

Úlcera	Punção perivenular		Total
	Presente	Ausente	
Presente	1	7	8
Ausente	7	45	52
Total	8	52	

$p=0,94$; $R=0,1$

Valores apresentados em números absolutos

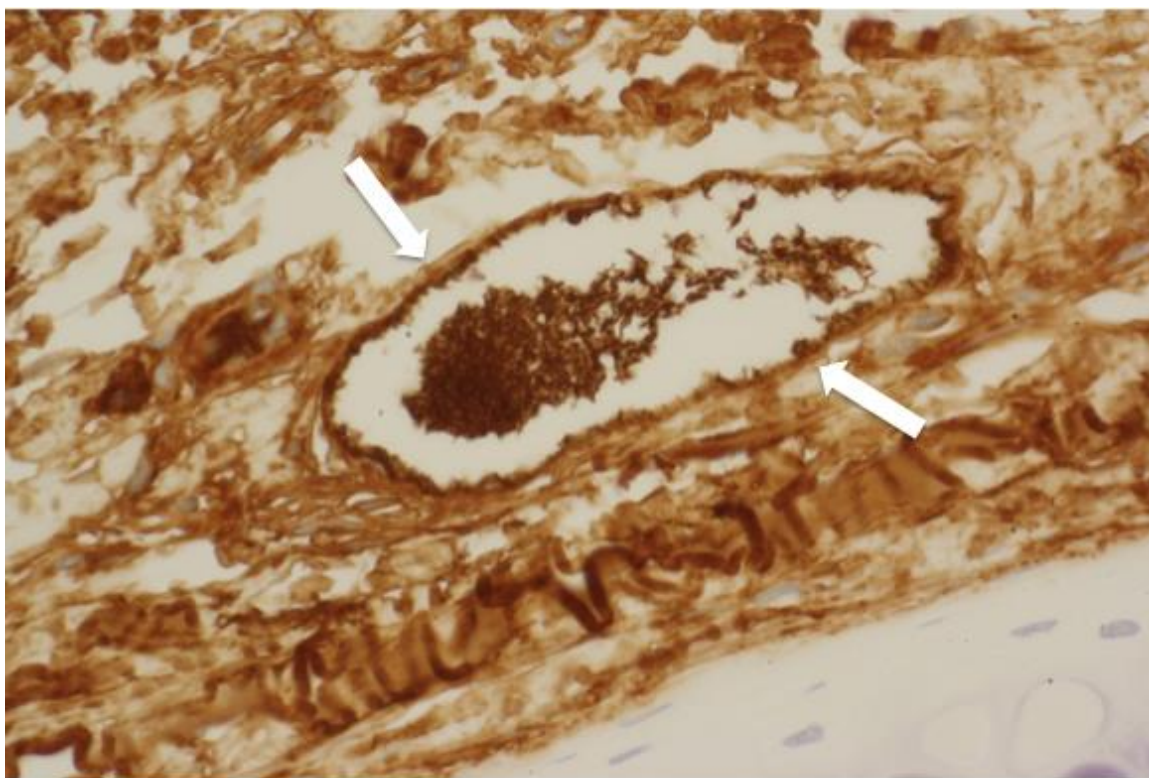


Figura 19 – Veia dorsal marginal realçada pelos marcadores CD31 e CD34 (setas brancas). Imunohistoquímica

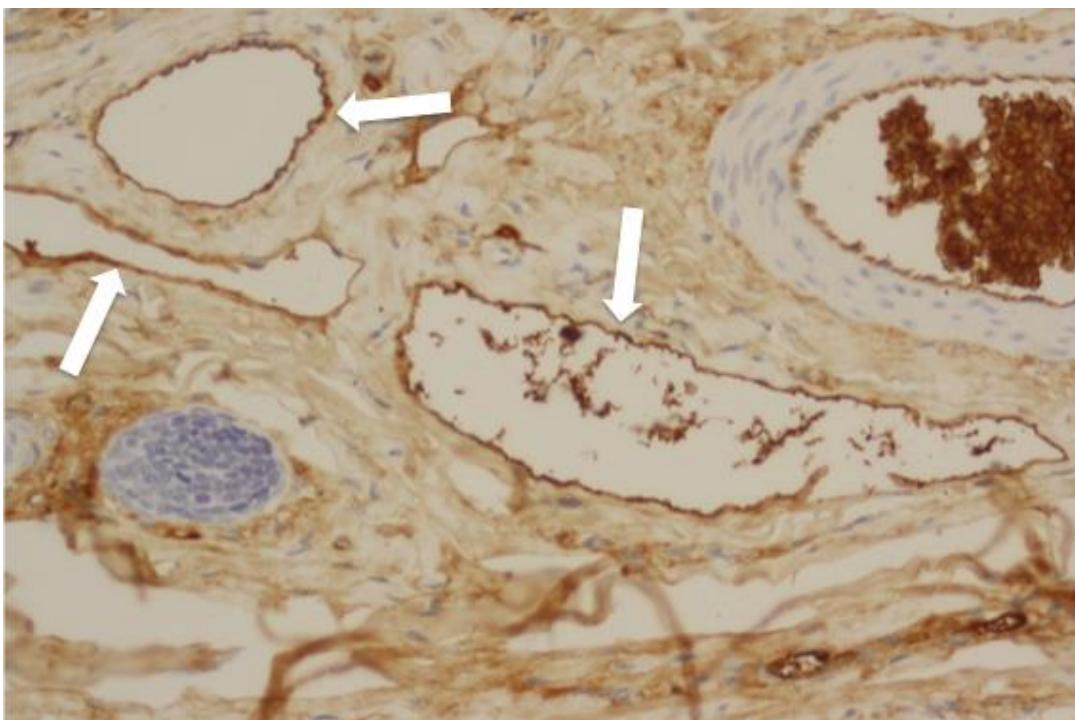


Figura 20 – Neoangiogênese (setas brancas) destacada pelos marcadores CD31 e CD34. Imunohistoquímica.

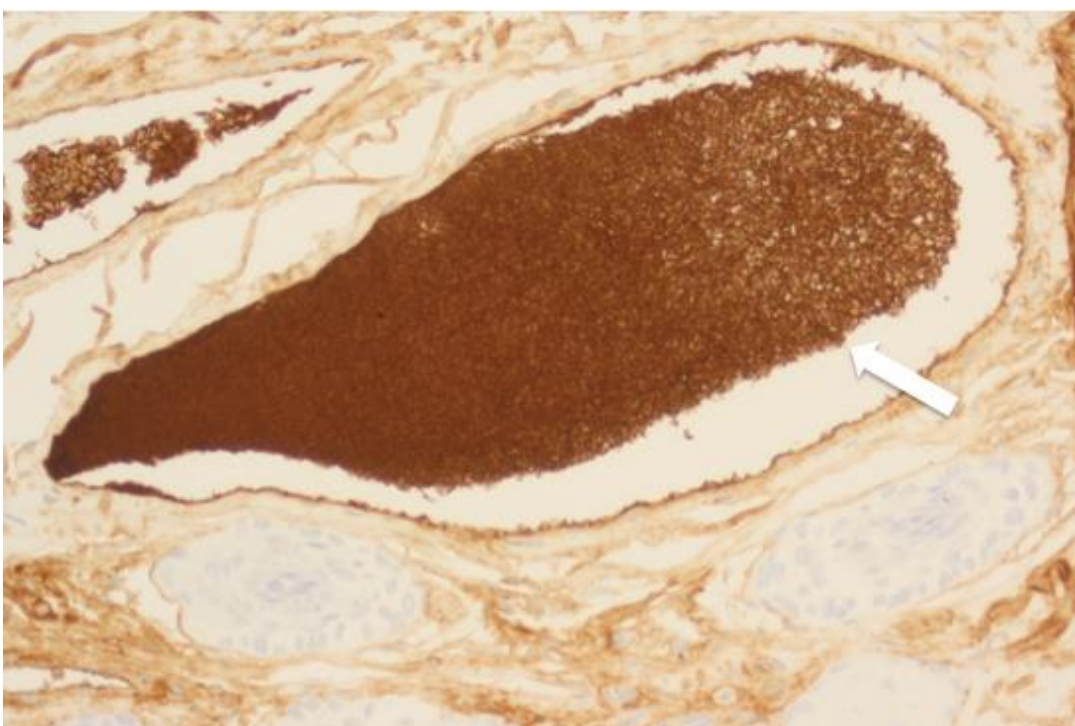


Figura 21 – Oclusão parcial da luz da veia dorsal marginal por trombo (seta branca). Imunohistoquímica (CD31 e CD34).

DISCUSSÃO

Discussão do método

O modelo experimental de esclerose de veias em orelha de coelho tem sido utilizado para analisar alterações clínicas e histológicas causadas pela infusão de agentes escleroterápicos.[13, 14, 35-41] A veia dorsal marginal da orelha do coelho é superficial e de fácil manejo, além de ser semelhante, em calibre (0,35 a 0,45mm de diâmetro), às telangiectasias no ser humano.[39, 41]

Sabe-se que na orelha do coelho há grande número de veias colaterais e rápida velocidade do fluxo sanguíneo local, em função da termorregulação própria desta topografia.[41] Nesse contexto, a manobra de compressão extrínseca por noventa segundos em toda a extensão da veia dorsal marginal da orelha do coelho teve o intuito de reduzir o fluxo sanguíneo dessa veia e promover maior contato do esclerosante com o endotélio do vaso tratado. De fato, a compressão extrínseca propicia a oclusão do vaso, além de reduzir a taxa de recanalização e complicações como flebite e hiperpigmentação.[44, 45] Goldman e cols.[41] ocluíram por 20 segundos a porção proximal e distal da veia dorsal marginal da orelha de coelhos após a infusão de alguns esclerosantes, incluindo o polidocanol na forma líquida em diferentes concentrações, a fim de reduzir o fluxo sanguíneo e melhorar a taxa de oclusão do vaso. Ivo e cols.[38] estudaram a influência exercida pela compressão extrínseca em estudo experimental usando polidocanol líquido a 1%, não encontrando melhora na taxa de oclusão do vaso, mesmo comprimindo-o por 120h (5 dias); também concluíram que a inflamação na esclerose da veia teve relação apenas com o tamanho do trombo formado, e não com a compressão exercida.[38]

O polidocanol é amplamente utilizado no tratamento escleroterápico de varizes.[26] Mais recentemente, tem sido empregado na forma de espuma para tratamento de varizes,

inclusive como tratamento alternativo à cirurgia convencional.[46-50] A técnica de confecção da espuma, difundida por Tessari e cols.[27], tornou-se bastante popular por ser de fácil reprodutibilidade e baixo custo, sendo a proporção entre gás e líquido esclerosante mais utilizada de 4:1.[21] No presente estudo foi usada essa mesma proporção. Não foi encontrado, na literatura pesquisada, qualquer estudo com modelo animal utilizando polidocanol na forma de espuma para escleroterapia. Apesar da recomendação do uso da concentração de polidocanol a 0,5% em forma de espuma para o tratamento de telangiectasias em humanos[17], foi escolhida a concentração de 1% para o polidocanol para este estudo experimental devido inconsistência nos resultados de estudos experimentais prévios quando se fez uso do polidocanol na forma líquida a 1%, com resultados variando de 50% de oclusão da luz do vaso[38] até 100% de esclerose[41]. Desta forma, teve-se a intenção de estudar neste modelo experimental a eficácia e segurança do polidocanol líquido 1% e comparar estes resultados com os obtidos com este mesmo esclerosante na forma de espuma e na mesma concentração(1%).

A glicose hipertônica é uma solução utilizada como esclerosante de telangiectasias e veias reticulares, tendo eficácia de 54%.[42] Tem como característica seu efeito hiperosmótico, causando lesão ao endotélio por desidratação.[26] Bertanha mostrou superioridade da solução de glicose a 70% associada a polidocanol a 0,2% comparada à solução de Glicose 75% no tratamento de telangiectasias e veias reticulares em pacientes[51]. Acredita-se que o efeito detergente do polidocanol associado ao efeito hiperosmótico da glicose hipertônica aumentariam a potência do esclerosante.[51] Além disso, a glicose a 75% é o esclerosante mais utilizado no Brasil, seguido da solução de polidocanol com glicose.[52] Assim, foram agentes esclerosantes escolhidos para estudo nesta pesquisa.

Limitações do modelo

Este modelo experimental apresenta como limitação o fato de a injeção ser feita com soluções esclerosantes em uma veia sadia, podendo interferir na acurácia dos resultados. Vale destacar também que, diferentemente da escleroterapia em humanos, em que se costuma realizar elastocompressão após uma sessão, este modelo dificulta a realização de tal manobra. Dessa forma, tem-se maior formação de flebite na veia dorsal marginal da orelha do coelho, o que propicia a recanalização da veia. Há também uma ampla rede de fístula arteriovenosa na orelha, gerando fluxo rápido na veia dorsal marginal, dificultando o processo de esclerose, além de facilitar o escape de agente esclerosante para ramos arteriais.[41] Finalmente, os efeitos trombogênicos e trombolíticos do animal são diferentes daqueles do ser humano. Apesar de possuírem contagem de plaquetas e tempo de protrombina semelhantes, o tempo de tromboplastina parcial ativado é em média 50% maior quando comparado aos do ser humano, levando maior tempo, portanto, para a formação do trombo.[53] Todavia, este modelo permite o estudo do mecanismo de ação de diversas soluções esclerosantes, tanto macroscopicamente quanto histologicamente.[54]

Discussão dos resultados macroscópicos

A melhor concentração de um esclerosante deve provocar uma lesão limitada ao endotélio vascular com conseqüente fibrose e oclusão do vaso. O dano excessivo ao vaso pode acarretar efeitos adversos como necrose, hiperpigmentação e *matting* telangiectásico.[37] Os resultados superiores do polidocanol a 1% em forma de espuma na esclerose foram confirmados tanto na análise macroscópica quanto na microscópica. Entretanto, não houve nenhum caso de esclerose completa do vaso. No estudo experimental de Goldman e cols.[41] houve esclerose completa e sem recanalização do vaso em todas as veias tratadas com polidocanol a 1% na forma líquida. As veias tratadas com polidocanol líquido a 0,5% e 0,25% não apresentaram sinais de esclerose ao final do estudo. Os autores

deste estudo não realizaram infusão de espuma de polidocanol. Ainda neste estudo[41], foram realizadas dez biópsias (1, 4, 8, 24 e 48 horas e 4, 8, 14, 30 e 60 dias após a injeção do escleroterápico) em cada orelha. Dessa forma, foram obtidos dados importantes para a análise histológica precoce da lesão vascular e, conseqüentemente, melhor compreensão do mecanismo de ação do esclerosante. Porém, a realização de dez biópsias em cada vaso pode ter afetado no resultado final, possivelmente contribuindo para uma elevada taxa de esclerose.

No grupo tratado com solução de PG, não houve melhora na eficácia em relação à esclerose, quando comparada ao grupo glicose. Assim, não se demonstrou que o efeito detergente adicional do polidocanol resultou em aumento da potência do esclerosante hiperosmótico (glicose hipertônica). Esse resultado diferiu do encontrado por Bertanha[51], que demonstraram superioridade da solução PG no tratamento de telangiectasias e veias reticulares em pacientes.

Apesar da espuma (polidocanol a 1%) provocar maior taxa de oclusão do vaso, houve também maior número de complicações, sendo esse tipo de esclerosante o único a provocar necrose na periferia da orelha. Um possível fator contribuinte para necrose é a ocorrência de escape da solução esclerosante para ramos terminais arteriais[20], devido intensa rede de colaterais que fazem anastomose arteriovenosa na orelha do coelho. A solução de espuma, ainda que infundida cuidadosa e lentamente, apresenta uma tendência de ser injetada com velocidade e pressão maiores que os demais esclerosantes. Outra complicação frequente neste grupo foi o aparecimento de úlceras em sítio de punção e de processo inflamatório local, quando comparado aos demais grupos. É importante destacar que a ocorrência de úlcera não se associou a punções perivenulares inadvertidas, uma vez que não houve correlação positiva entre os dois eventos. Rabe e cols. encontraram, em estudo com 316 pacientes, um caso de necrose e nenhum caso de úlcera no local da injeção em pacientes tratados com polidocanol (0,5% a 1%) na forma líquida.[33] Em estudo experimental em

coelhos, houve necrose de pele em todos os animais após a injeção subcutânea de polidocanol e tetradecil sulfato de sódio.[55] Por outro lado, em estudo em ratos, o extravasamento de polidocanol tanto na forma líquida como em espuma não causou necrose cutânea.[56]

Foi observada neovascularização à análise macroscópica de algumas orelhas tratadas com espuma, polidocanol líquido e glicose. A neovascularização, também conhecida como *matting* telangiectásico, consiste em finos vasos que aparecem ao redor do local aplicado e bem menores que as veias originalmente tratadas.[57] É uma complicação que ocorre em 5% a 35% dos pacientes tratados com escleroterapia.[20, 58] Alguns fatores tem implicado no desenvolvimento de neovascularização, incluindo numerosas e resistentes telangiectasias, grande volume de esclerosante infundido, distensão súbita do vaso durante a injeção, falta de compressão e elevada pressão exercida na infusão do esclerosante.[57]

Não foi evidenciado nenhum caso de pigmentação no presente estudo experimental. Essa complicação tem incidência que varia de acordo com o escleroterápico utilizado e sua concentração, podendo variar de 10,7%[59] a 60%[57] e ocorre principalmente devido ao depósito de hemossiderina em tecidos adjacentes ao vaso.[60]

A correlação positiva entre os efeitos adversos neoangiogênese, processo inflamatório e flebite precoce com esclerose reforça o conceito de que quanto maior a potência do escleroterápico para induzir a esclerose do vaso, maior será a quantidade de efeitos adversos relacionados. Isso reafirma a importância de se pesar a relação risco-benefício no uso de soluções esclerosantes mais potentes, porém com maior incidência de efeitos indesejáveis. Não obstante, também delinea a necessidade de se manterem pesquisas pelo agente esclerosante ideal, a fim de aquilatar maior eficácia associada a menos complicações num mesmo escleroterápico.

Discussão dos achados microscópicos

Com base nas análises microscópicas dos grupos estudados, observou-se que a espuma (polidocanol a 1%) foi o esclerosante mais eficaz. Tal fato corrobora com a hipótese de que esse agente, ao deslocar o sangue mecanicamente, permanece em contato com o endotélio por maior período de tempo e em uma maior área, o que acarreta no aumento da sua potência como esclerosante.[18, 27] Em estudo ex vivo, segmentos de veia varicosa de 5 a 10mm de diâmetro expostos a diferentes concentrações de polidocanol na forma de espuma mostraram melhor eficácia na esclerose com espuma a 1% em relação às concentrações de 0,5% e 2%.[61] Na literatura pesquisada, não se encontraram registros científicos experimentais em modelo animal apontando eficácia do polidocanol na forma de espuma, sendo então achados pioneiros e inéditos os elencados pelo presente estudo. Paralelamente, contudo, Goldman e cols.[41] demonstraram, em modelo experimental similar, eficácia microscópica do polidocanol a 1% na forma líquida comparado ao mesmo esclerosante em concentrações menores (0,5% e 0,25%). Posteriormente, Goldman e cols.[13], constataram a eficácia do polidocanol a 0,25% na forma líquida quando associado ao laser pulsado, utilizando o mesmo modelo experimental.

O extravasamento de sangue foi encontrado em todos os grupos estudados, porém com maior frequência no grupo controle (salina) e menor no grupo espuma. Sabendo-se que a solução de salina é considerada inócua ao vaso, acredita-se que esse escape sanguíneo tenha se dado pelo sítio de punção, e não por dano à parede do vaso. Ademais, a infusão de salina não provoca vasoconstrição, ao contrário do que ocorre com os outros escleroterápicos infundidos. O achado de extravasamento sanguíneo já foi previamente atribuído à destruição da parede do vaso, pela utilização de esclerosantes de maior potência.[13] Apesar da ausência de superioridade estatística deste achado no grupo controle, o presente estudo norteia que a ocorrência de extravasamento sanguíneo pode advir da infusão de substâncias inócuas ao vaso

ou mesmo com menor potência. Esse extravasamento pode, ainda, acarretar em equimose e predisposição à hiperpigmentação.[13]

Foi visualizada presença de macrófagos com pigmento de hemossiderina em orelhas tratadas com todas as soluções infundidas. Tal achado predispõe a uma das possíveis complicações do tratamento escleroterápico: a hiperpigmentação.[60] Porém, não se evidenciou este efeito adverso em nenhuma das orelhas estudadas até o 21º dia do tratamento.

No contexto dos achados microscópicos, destaca-se a presença de neoangiogênese, a qual se define como o surgimento de nova vascularização a partir de células endoteliais diferenciadas de um vaso pré-existente.[62] As células endoteliais têm papel importante no controle da coagulação, trombólise, tônus vascular, permeabilidade, inflamação, reparo tecidual e angiogênese.[63] No presente estudo, pioneiramente, lançou-se mão de imunohistoquímica com utilização dos marcadores CD31 e CD34 como ferramenta para avaliação de expressão de células endoteliais e de pequenos vasos (arteríolas e vênulas) como desfecho da escleroterapia. De fato, esses marcadores, quando combinados com as colorações hematoxilina-eosina e Elastica van Gieson foram fundamentais para a interpretação dos achados microscópicos, em particular a presença de neoangiogênese.

A neoangiogênese microscópica foi um achado pouco frequente, sendo observada em apenas quatro orelhas. Vale ressaltar que a angiogênese e a vasodilatação são fatores associados ao surgimento de *matting* telangiectásico, ainda que não se tenha uma causa plenamente estabelecida.[13] Entretanto, sabe-se que a presença de *matting* telangiectásico se dá proporcionalmente ao nível de inflamação e formação de trombo. É importante frisar, ainda, que a obstrução do escape sanguíneo advinda da escleroterapia é um dos fatores que contribuem para a angiogênese. Isso porque o dano endotelial resulta em liberação de histamina e outros mediadores, promovendo vasodilatação e angiogênese. Pode-se, assim, inferir que a escleroterapia propicia a formação de novos vasos.[13]

CONCLUSÃO

O presente estudo apontou eficácia macroscópica semelhante do polidocanol a 1% em forma de espuma quando comparado ao polidocanol na forma líquida a 1% e superior em relação aos demais grupos estudados. Microscopicamente, o polidocanol espuma foi o esclerosante mais eficaz. Porém, no quesito segurança, observou-se maior número de complicações nas orelhas tratadas com a espuma de polidocanol a 1%. Novos estudos experimentais são necessários para melhor definição do tipo de esclerosante, concentração e forma física ideais (espuma ou líquido).

REFERÊNCIAS**

1. Maffei FH, Magaldi C, Pinho SZ, Lastoria S, Pinho W, Yoshida WB, et al. Varicose veins and chronic venous insufficiency in Brazil: prevalence among 1755 inhabitants of a country town. *Int J Epidemiol.* 1986;15(2):210-7.
2. Crane C. The surgery of varicose veins. *Surg Clin North Am.* 1979;59(4):737-48.
3. Brito CJ. *Cirurgia vascular: cirurgia endovascular e angiologia.* 3a ed. Rio de Janeiro: Revinter; 2014. v. 2, 2362 p.
4. Bush R, Bush P. Evaluation of sodium tetradecyl sulfate and polidocanol as sclerosants for leg telangiectasia based on histological evaluation with clinical correlation. *Phlebology.* 2016; pii: 0268355516673768. doi: 10.1177/0268355516673768.
5. Rabe E, Guex JJ, Puskas A, Scuderi A, Fernandez Quesada F, VCP Coordinators. Epidemiology of chronic venous disorders in geographically diverse populations: results from the Vein Consult Program. *Int Angiol.* 2012;31(2):105-15.
6. Kistner RL, Eklof B, Masuda EM. Diagnosis of chronic venous disease of the lower extremities: the "CEAP" classification. *Mayo Clin Proc.* 1996;71(4):338-45.
7. Adhikari A, Criqui MH, Wooll V, Denenberg JO, Fronck A, Langer RD, et al. The epidemiology of chronic venous diseases. *Phlebology.* 2000;15:2-18.
8. Abbade LP, Lastoria S. Venous ulcer: epidemiology, physiopathology, diagnosis and treatment. *Int J Dermatol.* 2005;44(6):449-56.
9. Souza EM, Yoshida WB, de Melo VA, Aragão JA, de Oliveira LA. Ulcer due to chronic venous disease: a sociodemographic study in northeastern Brazil. *Ann Vasc Surg.* 2013;27(5):571-6.
10. Weiss RA, Heagle CR, Raymond-Martimbeau P. The Bulletin of the North American Society of Phlebology. Insurance Advisory Committee Report. *J Dermatol Surg Oncol.* 1992;18(7):609-16.
11. Goldman MP, Bennett RG. Treatment of telangiectasia: a review. *J Am Acad Dermatol.* 1987;17(2 Pt 1):167-82.
12. Dover JS, Sadick NS, Goldman MP. The role of lasers and light sources in the treatment of leg veins. *Dermatol Surg.* 1999;25(4):328-35; discussion 335-6.
13. Goldman MP, Martin DE, Fitzpatrick RE, Ruiz-Esparza J. Pulsed dye laser treatment of telangiectases with and without subtherapeutic sclerotherapy. Clinical and histologic examination in the rabbit ear vein model. *J Am Acad Dermatol.* 1990;23(1):23-30.
14. Lima PRS, Araújo M, Pitta GBB, Oliveira AFB, Pereira GCG, Baptista-Silva JCC. Eficiência do laser diodo 980nm em comparação à da glicose a 75% na oclusão de veias da orelha de coelhos. *J Vasc Bras.* 2011;10(2):110-8.
15. Godoy JMP. Fatores de risco e eventos trombóticos. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2009;31(3):122.
16. Rabe E, Pannier F. Sclerotherapy of varicose veins with polidocanol based on the guidelines of the German Society of Phlebology. *Dermatol Surg.* 2010;36 Suppl 2:968-75.

** International Committee of Medical Journal Editors. Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journal: sample references [Internet]. Bethesda: U.S. National Library of Medicine; 2016 [last updated 2016 Dec 28; cited 2017 Jan 12].

Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

National Library of Medicine. List of journals indexed in Index Medicus. Washington: NLM; 2008. 337p.

17. Rabe E, Pannier-Fischer F, Gerlach H, Breu FX, Guggenbichler S, Zabel M, et al. Guidelines for sclerotherapy of varicose veins (ICD 10: I83.0, I83.1, I83.2, and I83.9). *Dermatol Surg.* 2004;30(5):687-93; discussion 693.
18. Duffy DM. Sclerosants: a comparative review. *Dermatol Surg.* 2010;36 Suppl 2:1010-25.
19. Palm MD, Guiha IC, Goldman MP. Foam sclerotherapy for reticular veins and nontruncal varicose veins of the legs: a retrospective review of outcomes and adverse effects. *Dermatol Surg.* 2010;36 Suppl 2:1026-33.
20. Munavalli GS, Weiss RA. Complications of sclerotherapy. *Semin Cutan Med Surg.* 2007;26(1):22-8.
21. Frullini A, Cavezzi A. Sclerosing foam in the treatment of varicose veins and telangiectases: history and analysis of safety and complications. *Dermatol Surg.* 2002;28(1):11-5.
22. Guex JJ, Schliephake DE, Otto J, Mako S, Allaert FA. The French polidocanol study on long-term side effects: a survey covering 3,357 patient years. *Dermatol Surg.* 2010;36 Suppl 2: 993-1003.
23. Rao J, Wildemore JK, Goldman MP. Double-blind prospective comparative trial between foamed and liquid polidocanol and sodium tetradecyl sulfate in the treatment of varicose and telangiectatic leg veins. *Dermatol Surg.* 2005;31(6):631-5; discussion 635.
24. Albanese G, Kondo KL. Pharmacology of sclerotherapy. *Semin Intervent Radiol.* 2010;27(4):391-9.
25. Horbach SE, Lokhorst MM, Saeed P, de Gouyon Matignon de Pontouraude CM, Rothová A, van der Horst CM. Sclerotherapy for low-flow vascular malformations of the head and neck: A systematic review of sclerosing agents. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2016;69(3):295-304.
26. Weiss MA, Hsu JT, Neuhaus I, Sadick NS, Duffy DM. Consensus for sclerotherapy. *Dermatol Surg.* 2014;40(12):1309-18.
27. Tessari L, Cavezzi A, Frullini A. Preliminary experience with a new sclerosing foam in the treatment of varicose veins. *Dermatol Surg.* 2001;27(1):58-60.
28. Cavezzi A, Tessari L. Foam sclerotherapy techniques: different gases and methods of preparation, catheter versus direct injection. *Phlebology.* 2009;24(6):247-51.
29. Morrison N, Neuhardt DL, Rogers CR, McEown J, Morrison T, Johnson E, et al. Comparisons of side effects using air and carbon dioxide foam for endovenous chemical ablation. *J Vasc Surg.* 2008;47(4):830-6.
30. Beckitt T, Elstone A, Ashley S. Air versus physiological gas for ultrasound guided foam sclerotherapy treatment of varicose veins. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2011;42(1):115-9.
31. Kern P, Ramelet AA, Wutschert R, Bounameaux H, Hayoz D. Single-blind, randomized study comparing chromated glycerin, polidocanol solution, and polidocanol foam for treatment of telangiectatic leg veins. *Dermatol Surg.* 2004;30(3):367-72; discussion 372.
32. McCoy S, Evans A, Spurrier N. Sclerotherapy for leg telangiectasia--a blinded comparative trial of polidocanol and hypertonic saline. *Dermatol Surg.* 1999;25(5):381-5; discussion 385-6.
33. Rabe E, Schliephake D, Otto J, Breu FX, Pannier F. Sclerotherapy of telangiectases and reticular veins: a double-blind, randomized, comparative clinical trial of polidocanol, sodium tetradecyl sulphate and isotonic saline (EASI study). *Phlebology.* 2010;25(3):124-31.

34. Goldman MP. Treatment of varicose and telangiectatic leg veins: double-blind prospective comparative trial between aethoxyskerol and sotradecol. *Dermatol Surg.* 2002;28(1):52-5.
35. Goldman MP. A comparison of sclerosing agents. Clinical and histologic effects of intravascular sodium morrhuate, ethanolamine oleate, hypertonic saline (11.7%), and sclerodex in the dorsal rabbit ear vein. *J Dermatol Surg Oncol.* 1991;17(4):354-62.
36. Goldman MP, Raymond-Martimbeau P. Clinical and histologic evaluation of polyiodinated iodine with and without hypertonic saline/dextrose in the rabbit ear vein model. *Dermatol Surg.* 1997;23(8):701-4.
37. Martin DE, Goldman MP. A comparison of sclerosing agents: clinical and histologic effects of intravascular sodium tetradecyl sulfate and chromated glycerin in the dorsal rabbit ear vein. *J Dermatol Surg Oncol.* 1990;16(1):18-22.
38. Ivo CS, Ivo MB, Salles PGO, Rosário RCV, Nunes TA. Effect of the period of extrinsic mechanical compression following sclerotherapy in veins in rabbit ears. *Acta Cir Bras.* 2011;26(3):165-73.
39. Alghamdi KM, Ashour AE, Rikabi AC, Moussa NA. Phenol as a novel sclerosing agent: A safety and efficacy study on experimental animals. *Saudi Pharm J.* 2014;22(1):71-8.
40. Vural AH, Kocogullari C, Ozyazicioğlu N, Göncü T, Ozcan A, Yalçinkaya S, et al. Histological results of sclerotherapy, phototherapy, and pulsed 980-nm laser irradiation of the dorsal rabbit ear vein. *Photomed Laser Surg.* 2008;26(5):467-71.
41. Goldman MP, Kaplan RP, Oki LN, Cavender PA, Strick RA, Bennett RG. Sclerosing agents in the treatment of telangiectasia. Comparison of the clinical and histologic effects of intravascular polidocanol, sodium tetradecyl sulfate, and hypertonic saline in the dorsal rabbit ear vein model. *Arch Dermatol.* 1987;123(9):1196-201.
42. Bourgeois A, Quillard J, Constantin JM, Cottin P, Cosson JP, Le Baleur A, et al. [66% glucose, a safe sclerosant. Experimental study]. *J Mal Vasc.* 1984;9(2):97-9. French.
43. Fisher LD. *Biostatistics - A methodology for the health sciences.* New York: Wiley - Interscience; 1993. 991 p.
44. Nootheti PK, Cadag KM, Magpantay A, Goldman MP. Efficacy of graduated compression stockings for an additional 3 weeks after sclerotherapy treatment of reticular and telangiectatic leg veins. *Dermatol Surg.* 2009;35(1):53-7; discussion 57-8.
45. Kern P, Ramelet AA, Wütschert R, Hayoz D. Compression after sclerotherapy for telangiectasias and reticular leg veins: a randomized controlled study. *J Vasc Surg.* 2007;45(6):1212-6.
46. Redondo P, Cabrera J. Microfoam sclerotherapy. *Semin Cutan Med Surg.* 2005;24(4):175-83.
47. Bunke N, Brown K, Bergan J. Foam sclerotherapy: techniques and uses. *Perspect Vasc Surg Endovasc Ther.* 2009;21(2):91-3.
48. Alos J, Carreño P, López JA, Estadella B, Serra-Prat M, Marinell-Lo J. Efficacy and safety of sclerotherapy using polidocanol foam: a controlled clinical trial. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2006;31(1):101-7.
49. Campos W Jr, Torres IO, da Silva ES, Casella IB, Puech-Leão P. A prospective randomized study comparing polidocanol foam sclerotherapy with surgical treatment of patients with primary chronic venous insufficiency and ulcer. *Ann Vasc Surg.* 2015;29(6):1128-35.
50. Figueiredo M, Araújo S, Barros N Jr, Miranda F Jr. Results of surgical treatment compared with ultrasound-guided foam sclerotherapy in patients with varicose veins: a prospective randomised study. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2009;38(6):758-63.

51. Bertanha M. Estudo clínico randomizado e duplo cego coparando dois métodos de escleroterapia para veias reticulares e telangiectasias em membros inferiores [tese]. Botucatu: Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista; 2016.
52. Figueiredo M, Figueiredo MF. Survey about liquid sclerotherapy of lower limb varicose veins. *J Vasc Bras. J Vasc Bras.* 2013 Mar; 12(1):10-15
53. Siller-Matula JM, Plasenzotti R, Spiel A, Quehenberger P, Jilma B. Interspecies differences in coagulation profile. *Thromb Haemost.* 2008;100(3):397-404.
54. Goldman MP. Sclerotherapy: treatment of varicose and telangiectatic leg veins. 5th ed. Philadelphia: Elsevier; 2011.
55. Goldman MP, Kaplan RP, Oki LN, Bennett RG, Strick RA. Extravascular effects of sclerosants in rabbit skin: a clinical and histologic examination. *J Dermatol Surg Oncol.* 1986;12(10):1085-8.
56. Schuller-Petrovic S, Pavlović MD, Neuhold N, Brunner F, Wölkart G. Subcutaneous injection of liquid and foamed polidocanol: extravasation is not responsible for skin necrosis during reticular and spider vein sclerotherapy. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2011;25(8):983-6.
57. Norris MJ, Carlin MC, Ratz JL. Treatment of essential telangiectasia: effects of increasing concentrations of polidocanol. *J Am Acad Dermatol.* 1989;20(4):643-9.
58. Wolinsky S. Complication after sclerotherapy. *J Dermatol Surg Oncol.* 1985;11(12):1154-85.
59. Cacciatore E. [Experience with Atoxisclerol in sclerotherapy]. *Minerva Cardioangiol.* 1979;27(4):255-62. Italian.
60. Goldman MP, Kaplan RP, Duffy DM. Postsclerotherapy hyperpigmentation: a histologic evaluation. *J Dermatol Surg Oncol.* 1987;13(5):547-50.
61. Erkin A, Kosemehmetoglu K, Diler MS, Koksall C. Evaluation of the minimum effective concentration of foam sclerosant in an ex-vivo study. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2012;44(6):593-7.
62. Yoshida WB. Angiogênese, arteriogênese e vasculogênese: tratamento do futuro para isquemia crítica de membros? *J Vasc Bras.* 2005;4(4):316-8.
63. Pusztaszeri MP, Seelentag W, Bosman FT. Immunohistochemical expression of endothelial markers CD31, CD34, von Willebrand factor, and Fli-1 in normal human tissues. *J Histochem Cytochem.* 2006;54(4):385-95.

ANEXO

Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Animal

unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE BOTUCATU
FACULDADE DE MEDICINA

SECRETARIA DE MEDICINA
FMB
BOTUCATU

CEUA
Comissão de Ética no Uso de Animais

Criada através da Portaria DFM nº 611 de 13/12/2012

Certificado

CERTIFICAMOS que o (Protocolo CEUA 1007/2013) Comparação de eficácia de espuma de polidocanol feita com ar ou com gás fisiológico e mistura de polidocanol com glicose na esclerose de veias. Estudo experimental em coelhos, a ser conduzido por Carlos Eduardo P. Lucio Filho, orientado pelo Prof. Dr. Winston Bonetti Yoshida e Co-orientado pelo Prof. Dr. Matheus Bertanha, está de acordo com o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, com a ressalva de que os "coelhos" são provenientes de Biotério convencional, sem condições de atestar a Sanidade dos mesmos.

Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEUA em 28/02/2013

Maria Rosa Bet Moraes Silva
Prof.ª Dr.ª Maria Rosa Bet Moraes Silva
Presidente da CEUA

Alberto Santos Capelluppi
Alberto Santos Capelluppi
Secretário da CEUA

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P. CEP: 18.618-970 Fone: (14) 3880-1608/3860-1609 e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br

APÊNDICE**Ficha de avaliação do Projeto “COMPARAÇÃO DA EFICÁCIA DE DIFERENTES TIPOS DE ESCLEROTERÁPICOS UTILIZADOS ROTINEIRAMENTE NA ESCLEROSE DE VEIAS RETICULARES. ESTUDO EXPERIMENTAL EM COELHOS”**

ORELHA ____

RESULTADO

A veia foi esclerosada ()totalmente ()parcialmente ()não foi esclerosada

Extensão de veia esclerosada (com ImageJ) __ cm

Extensão total da veia (com ImageJ) na imagem pré tratamento ____cm

Diâmetro da veia esclerosada (com ImageJ) na imagem pré tratamento ____cm

COMPLICAÇÕES:

Flebite ()presente ()ausente

Necrose de pele ()presente ()ausente

Úlcera ()presente ()ausente

Reação inflamatória local ()presente ()ausente

Neovascularização ()presente ()ausente

Outra lesão _____