

**ERICA CALCAGNO RAYMUNDO DA SILVA**

**DIÓXIDO DE CARBONO NA SECREÇÃO DO  
PEPTÍDEO RELACIONADO COM GENE DE  
CALCITONINA E SUBSTÂNCIA P EM PELE  
DE RATOS**

Tese apresentada à Universidade  
Federal de São Paulo – Escola  
Paulista de Medicina, para obtenção  
do título de Mestre em Ciências

**SÃO PAULO**

**2013**

**ERICA CALCAGNO RAYMUNDO DA SILVA**

**DIÓXIDO DE CARBONO NA SECREÇÃO DO  
PEPTÍDEO RELACIONADO COM GENE DE  
CALCITONINA E SUBSTÂNCIA P EM PELE  
DE RATOS**

Tese apresentada à Universidade  
Federal de São Paulo – Escola  
Paulista de Medicina, para obtenção  
do título de Mestre em Ciências

**ORIENTADORA: Profa. Dra. LYDIA MASAHO FERREIRA**

**COORIENTADORES: Prof. Dr. BERNARDO HOCHMAN**

**Prof. Dr. GERSON CHADI**

**SÃO PAULO**

**2013**

Calcagno Raymundo da Silva, Erica

**Dióxido de Carbono na Secreção do Peptídeo relacionado com Gene de Calcitonina e Substância P em Pele de Ratos.**/ Erica Calcagno Raymundo da Silva --São Paulo, 2013.

XXIII, 100f.

Tese (Mestrado) Universidade Federal de São Paulo. Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Translacional.

Título em inglês: Carbon Dioxide in the discharge of the Gene Related Peptide Calcitonin and Substance P in rat skin

1. Dióxido de Carbono; 2. Inflamação Neurogênica; 3. Substância P; 4. Peptídeo Relacionado com Gene de Calcitonina; 5. Pele; 6. Ratos.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO –  
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA  
TRANSLACIONAL**

**COORDENADOR: Prof. Dr. MIGUEL SABINO NETO**

**DEDICATÓRIA**

## DEDICATÓRIA

*Dedico a primeiramente; a Deus! Que sempre me deu forças através de minha imensa fé, respeito e submissão!!! “Posso todas as coisas em Cristo, que me fortalece”*

*À minha família, meu marido Marcos Lemes da Silva e minha princesa Maria Eduarda Calcagno Lemes, que me deram apoio, amor e compreensão necessários ao desenvolvimento deste trabalho. Pois foram muitos os momentos de abdicação á eles para que este trabalho fosse concluído.*

*À minha querida mãe, que deixou um imenso vazio em minha vida, sinto falta de seu carinho, amor e dedicação, mas conheço e respeito a vontade de nosso Deus, sabendo que esta conquista só foi possível com sua doce presença me apoiando e me dando forças para prosseguir, serei sempre grata ao seu amor!!!!*

*Ao meu querido pai, que se ausentou da vida há nove anos e que faz muita falta, pois sua maior alegria era ver suas filhas conquistando sonhos!!! Sempre dando exemplo de honra, integridade, honestidade, gratidão, amor e amizade, obrigada pai, serei sempre grata ao seu imenso amor!!!!*

*Às minhas irmãs, que são minhas amigas e companheiras de todas as horas, que sabem ouvir e dedicar seu tempo em prol do amor e da família, que acreditaram em mim quando eu mesma não acreditava devido às dificuldades e percalços da vida. Obrigada por serem irmãs tão queridas e presentes, sem vocês seria impossível prosseguir!!!*

*Amo vocês.*

*Aos meus sobrinhos queridos, Isabel e Mateus que renovam as alegrias e as esperanças em nossas vidas, com a pureza e inocência das crianças. Amando incondicionalmente.*

## **AGRADECIMENTOS**

## **AGRADECIMENTOS**

À **PROFA. DRA. LYDIA MASAKO FERREIRA**, Professora Titular da Disciplina de Cirurgia Plástica do Departamento de Cirurgia da Universidade Federal de São Paulo- UNIFESP (desde 1996), vice-Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Plástica da UNIFESP e orientadora deste trabalho, por ter me orientado durante todo o estudo com diversas críticas construtivas para a melhora da tese, além de servir como exemplo de liderança e conhecimento. Fico extremamente grata pelo conhecimento concedido durante toda essa trajetória, o qual será guardado e lembrado sempre.

Ao **PROF. BERNARDO HOCHMAN**, Professor Orientador do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Plástica da UNIFESP, por ter contribuído na elaboração deste estudo, pelas instruções e questionamentos no desenvolvimento e término deste estudo.

Agradeço ao **PROF. GERSON CHADI** Professor Titular do Departamento de Neurologia, Chefe da Disciplina de Neurologia Experimental e Chefe do Laboratório de Fisiopatologia Neurocirúrgica-LIM45 e Coordenador do Grupo de Estudos em Neuroregeneração da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e sua equipe, pelo apoio e dedicação durante a execução deste trabalho.

Á querida colega **MICHELE AKEMI NISHIOKA**, fisioterapeuta, mestre em Ciências da Saúde pelo programa de Pós-Graduação em



Cirurgia Plástica da UNIFESP, por sua dedicação, apoio e incentivo durante toda trajetória deste trabalho. Agradeço a Deus por sua vida!!!

Às secretárias da Disciplina de Cirurgia Plástica da UNIFESP, **SANDRA DA SILVA, MARTA REJANE DOS REIS SILVA** e **SILVANA APARECIDA COSTA DE ASSIS**, pela imensa dedicação, carinho e respeito, que me ajudaram durante a estada no Aperfeiçoamento e Mestrado em Cirurgia Plástica da UNIFESP.

À minhas colegas fisioterapeutas, **ARAYNE ANTUNES, PAOLA MONTEIRO, SILVELENA BONATTI**, alunas do programa de pós graduação de Cirurgia Translacional da UNIFESP, pelo apoio, dedicação e amizade, foi um imenso prazer conhecê-las. Aos amigos cirurgiões plásticos, **GUILHERME LAPIN, JOSÉ OCTAVIO GONÇALVES FREITAS, PAULO QUIEREGATTO**, alunos do programa de pós graduação de Cirurgia Translacional da UNIFESP, que durante essa trajetória tornaram-se grandes amigos, pelo carinho, apoio e confiança.

Ao médico assistente da UNIFESP, **FELIPE ISOLDI**, pela colaboração e empenho no laboratório de cirurgia experimental do Departamento de Cirurgia da EPM.

Agradeço a Empresa **TOP LASER BRASIL**, que cedeu o equipamento de carboxiterapia da marca **IBRAMED**, para o desenvolvimento deste estudo, obrigada pela confiança e apoio, sem nenhum conflito de interesses.

Manifesto minha gratidão pelas vidas dos ratos, animais que foram sacrificados em prol ao desenvolvimento deste estudo, permitindo assim o avanço científico.

**ΕΠΙΓΡΑΦΕ**

*"É graça divina começar bem.  
Graça maior é persistir na  
caminhada certa. Mas a graça das  
graças é não desistir nunca."*

*(Dom Hélder Câmara)*

## **SUMÁRIO**

# SUMÁRIO

DEDICATÓRIA .....	VI
AGRADECIMENTOS.....	VIII
EPÍGRAFE.....	XI
SUMÁRIO .....	XIII
LISTA DE FIGURAS .....	XVI
LISTA DE TABELAS .....	XVIII
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS .....	XX
RESUMO .....	XXV
1. INTRODUÇÃO .....	2
2. OBJETIVO.....	6
3. LITERATURA.....	8
3.1 Neuropeptídeos.....	8
3.2 Dióxido de Carbono.....	14
4. MÉTODOS .....	21
4.1 Desenho do Estudo.....	21
4.2 Local do Estudo.....	21
4.3 Amostra.....	21
4.4 Delineamento do Estudo.....	22
4.5 Procedimentos Experimentais.....	25
4.5.1 Anestesia.....	25
4.6 Exérese da amostra.....	28
4.7 Extração de Proteínas e <i>Western Blotting</i> .....	32
4.8 Análise Estatística.....	34
5. RESULTADOS .....	36
6. DISCUSSÃO .....	41
6.1 Perspectivas.....	51
7. CONCLUSÃO .....	54
8. REFERÊNCIAS .....	56
NORMAS ADOTADAS.....	67
ABSTRACT.....	70
APÊNDICES .....	72
Apêndice 1: APROVAÇÃO PELO CEP .....	72
Apêndice 2: Dados utilizados para análise estatística dos resultados de neuropeptídeos Substância P (SP), Pró-Peptídeo Relacionado com o Gene de Calcitonina (Pró-CGRP) 15 kDa e CGRP 5 kDa. ....	74
Apêndice 3: Análise descritiva dos dados dos neuropeptídeos SP, Pró CGRP 15 kDa e CGRP 5 kDa.....	75
Apêndice 4: Teste Mann Whitney para grupo de Neuropeptídeos Pró-CGRP 15 kDa com <i>outlier</i> . ....	76
Apêndice 5: Teste Mann Whitney para grupo de Neuropeptídeos Pró-CGRP 15 kDa sem <i>outlier</i> .....	77
Apêndice 6: Teste Mann Whitney para grupo de Neuropeptídeos CGRP 5 kDa. ....	78
Apêndice 7: Teste Mann Whitney para grupo de Neuropeptídeos SP.....	79
ANEXOS .....	81

Anexo 1: Máquina de cortar cabelo – Marca WAHL®.....	81
Anexo 2: Dermátomo Elétrico – Marca Integra/Padgett® .....	82
Anexo 3: <i>Punch</i> cutâneo de 4 mm de diâmetro – Marca Richter® .....	83
Anexo 4: Ficha de informações de segurança de produtos químicos conforme NBR 14725.....	84
Anexo 5: Bula do gás medicinal CO <sub>2</sub> .....	92
Anexo 6: Rótulo “Gama Gases” .....	93
Anexo 7 : Estudo-Piloto - Tempo de reposição de SP e CGRP após incisão em pele de ratos <sup>94</sup>	
Anexo 8 : Estudo-Piloto - Desenho experimental para quantificação dos neuropeptídeos cutâneos SP e CGRP com Western Blotting.....	97
FONTES CONSULTADAS .....	100

## **LISTA DE FIGURAS**

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Distribuição dos Grupos do estudo.	25
FIGURA 2 – Determinação do ponto da injeção dos gases	26
FIGURA 3 – Injeção dos gases	27
FIGURA 4 – Expansão da pele	29
FIGURA 5 – Posição do <i>punch</i>	29
FIGURA 6 – Dermátomo Elétrico	30
FIGURA 7 – Pele parcial retirada	30
FIGURA 8 – Amostra de pele padronizada	31
FIGURA 9 – Gráfico CGRP 15 kDa	36
FIGURA 10 – Gráfico CGRP 5 kDa	37
FIGURA 11 – Gráfico SP	38



## **LISTA DE TABELAS**

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Quantificação dos Neuropeptídeos SP, Pró-CGRP 15 kDa e CGRP 5 kDa.	74
TABELA 2 - Estatísticas descritivas dos Neuropeptídeos SP, Pró-CGRP 15 kDa e CGRP 5 kDa.	75
TABELA 3 - Comparações dos Neuropeptídeos Pró-CGRP 15 kDa com <i>outlier</i> .	76
TABELA 4 - Comparações dos Neuropeptídeos Pró-CGRP 15 kDa sem <i>outlier</i> .	77
TABELA 5 Comparações dos Neuropeptídeos CGRP 5 kDa.	78
TABELA 6 - Comparações dos Neuropeptídeos SP.	79

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS**

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

$\mu\text{m}$	Micrômetro
5-HT	Serotonina
AMP tissular	Adenilciclase
Bk	Bradicinina
BSA	Soroalbumina Bovina ( <i>Bovine Serum Albumin</i> )
CEDEME	Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia
CGRP	Peptídeo Relacionado com o Gene de Calcitonina ( <i>Calcitonin Gene Related Peptide</i> )
CGRP (15 kDa)	Peptídeo Relacionado com o Gene de Calcitonina ( <i>Calcitonin Gene Related Peptide</i> ) de quinze quilodáltons
CGRP (5 kDa)	Pró-Peptídeo Relacionado com o Gene de Calcitonina ( <i>Calcitonin Gene Related Peptide</i> ) de cinco quilodáltons
cm	Centímetros
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
CRH	Hormônio Liberador de Corticotropina
CVLI	Insuficiência Venolinfática Crônica
DAP	Doença Arterial Periférica
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
ECE	Enzima Conversora de Endotelina

EDTA	Ácido Edético ( <i>Edetic Acid</i> )
EGTA	Ácido Egtácico ( <i>Egtazic Acid</i> )
ELISA	Ensaio de Imunoadsorção Enzimática ( <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> )
EPM	Escola Paulista de Medicina
FEG	Fibroedema Geloide
FITC	Fluoresceína Isotiocianato
G	Indica o comprimento da injeção em polegadas
GPCR	Receptor acoplado à proteína G ( <i>G Protein-Coupled Receptor</i> )
H+	Hidrogênio
i.a.	Intra-Arterial
i.v.	Intravenoso
ICM	Isquemia Crítica de Membros
IHQ	Imunoistoquímica
IL-1, IL-2,IL-3, IL-4, IL-5, IL-6	Interleucinas
IN	Inflamação Neurogênica
IVC	Insuficiência Venosa Crônica
KCl	Cloreto de Potássio
Kg	Kilogramas
MD	Microdiálise
mg	Miligramas
min	Minuto
ml	Mililitro
mm	Milímetro
mmol	Milimolar

MSH	Hormônios Estimuladores de Melanócitos
NEP	Neprilisina ( <i>Neutral Endopeptidase</i> )
NGF	Fator de Crescimento Neural ( <i>Nerve Growth Factor</i> )
NK-1	Neurocinina-1
NK-A	Neurocinina A
NO	Oxido Nítrico
NP's	Neuropeptídeos
NPY	Neuropeptídeo Y
O <sub>2</sub>	Oxigênio Livre
°C	Graus Celsius
PACAP	Polipeptídeo Ativador da Adenilato-Ciclase
PaCO <sub>2</sub>	Pressão Arterial de Dióxido de Carbono
PaO <sub>2</sub>	Pressão Arterial de Oxigênio
pH	Potencial de Hidrogênio
PVDF	Fluoreto de Polivinilideno ( <i>PolyVinylidene Fluoride</i> )
RIE	Radioimunoensaio
SAR	Rinite Alérgica Sazonal
SDS	Dodecilsulfato de Sódio ( <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> )
SNA	Sistema Nervoso Autônomo
SNAP	Sinaptolisinas
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
SP	Substância P
SPA	Estância Tremal
TBS	Tampão Trisma-Salina
TBS-T	Tampão Trisma-Salina com <i>Tween</i>
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral $\alpha$

TNSS	Escore Total de Sintomas Nasais ( <i>Total Score of Nasal Symptoms</i> )
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo
USP	Universidade de São Paulo
VIP	Peptídeo Vasoativo Intestinal ( <i>Vasoactive Intestinal Peptide</i> )
WB	<i>Western Blotting</i>

**RESUMO**



## RESUMO

**Introdução:** Estudos sugerem que o CO<sub>2</sub> promova estímulo dos efeitos fisiológicos como, vasodilatação, formação de colágeno e fibras elásticas. A Inflamação Neurogênica (IN) é um dos primeiros eventos da cicatrização em resposta a um estímulo nociceptivo na pele, onde há liberação de neuropeptídeos (NP's) pró-inflamatórios secretados por terminações nervosas, sendo lançados na fase inflamatória da cicatrização. Entretanto não há estudos que relacionem a injeção de CO<sub>2</sub> com a IN. **Objetivo:** investigar a injeção de Dióxido de Carbono (CO<sub>2</sub>) na secreção dos neuropeptídeos Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina (CGRP) e Substância P (SP) em pele de ratos. **Métodos:** foram utilizados 56 ratos Wistar-EPM distribuídos em dois grupos, um para análise de CGRP e outro de SP. Cada grupo foi subdividido em 4 subgrupos: controle, controle agulha, injeção de CO<sub>2</sub> e injeção de ar atmosférico, contendo 7 animais respectivamente em cada subgrupo. As análises das amostras de pele parcial foram feitas por *Western Blotting* (WB). **Resultados:** No grupo SP houve uma diminuição na quantidade de neuropeptídeos no subgrupo 3 SP-CO<sub>2</sub> e no subgrupo 4 SP -ar; no grupo CGRP, houve uma diminuição da quantidade de neuropeptídeos pró-CGRP (15 kDa) no subgrupo 3 CGRP-CO<sub>2</sub> e no subgrupo 4 CGRP- ar; não houve diminuição da quantidade de CGRP (5 kDa). **Conclusão:** A injeção de CO<sub>2</sub> e de ar atmosférico em pele de ratos diminuiu a quantidade de neuropeptídeos SP e pró-CGRP (15 kDa).

## **INTRODUÇÃO**

## 1. INTRODUÇÃO

A carboxiterapia é uma técnica que teve origem em 1930, na qual o Dióxido de Carbono ( $\text{CO}_2$ ) é injetado através de uma agulha no tecido subcutâneo. Estima-se que promova o aumento da circulação e da oxigenação dos tecidos. Segundo SCORZA (2008), as lesões provocadas pela agulha e pelo gás desencadeiam um processo inflamatório local, resultando em cicatrização do tecido, proliferação de vasos sanguíneos (angiogênese) e fibroblastos (fibrogênese). Esses efeitos podem ocorrer devido a um aumento da hipercapnia induzida pelo fluxo sanguíneo capilar, queda no consumo de oxigênio cutâneo, ou por um deslocamento para a direita da curva de dissociação do oxigênio ( $\text{O}_2$ ) (efeito *Bohr*) (TORIYAMA *et al.*, 2002).

A ação farmacológica do  $\text{CO}_2$  sobre o tecido provoca uma redução da afinidade da hemoglobina pelo oxigênio, resultando em maior disponibilidade de oxigênio para os tecidos. A presença de níveis mais altos de  $\text{CO}_2$  e prótons ( $\text{H}^+$ ) nos capilares dos tecidos em metabolismo ativo promove liberação de  $\text{O}_2$  na hemoglobina (TORIYAMA *et al.*, 2002).

VAUSE *et al.* estudaram em 2007 os efeitos do  $\text{CO}_2$  em culturas primárias de gânglios trigeminais em ratos e seus reflexos na secreção de CGRP. Os autores concluíram que o  $\text{CO}_2$  inibe a ativação do nervo sensorial e também inibe a liberação do neuropeptídeo Peptídeo Relacionado com o Gene de Calcitonina (CGRP). Além disso, o efeito inibitório observado do  $\text{CO}_2$  sobre a secreção de CGRP provavelmente envolve a modulação da atividade dos canais de cálcio e alterações do pH intracelular.

O CGRP é um neuropeptídeo associado à proliferação de queratinócitos (HARA *et al.*, 1996) assim como à liberação de quimiocinas e de Substância P (SP), agindo sobre arteríolas e resultando em vasodilatação, edema, acúmulo de neutrófilos e liberação de interleucinas IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, (BRAIN *et al.*, 1989). Tem ação pouco estabelecida em mastócitos, células de Merkel, melanócitos, queratinócitos e células de Langerhans (WIMALAWANSA, 1996).

Os mediadores inflamatórios clássicos, bradicinina (BK), serotonina (5-HT), histamina e prostaglandinas, bem como pH ácido, são excitatórios diretos e/ou sensibilizantes dos efeitos nociceptivos aferentes primários (VYKLICKÝ *et al.*, 1998). Os mediadores induzem a secreção de neuropeptídeos que estimulam a formação de prostaglandinas no tecido, o que vem sendo mostrado em vários estudos até o momento (HUA & YAKSH, 1993).

Sendo assim, um dano tecidual ou estímulo doloroso, mecânico, térmico, estímulo elétrico, mediadores inflamatórios, alérgenos e/ou extratos de plantas, podem desencadear a inflamação neurogênica (KALIL-GASPAR, 2003).

O conceito de inflamação neurogênica reside no fato que, quando há um estímulo nociceptivo que caminha para o processamento medular, há também um reflexo axonal, antidrômico às terminações nervosas das fibras A e C, com conseqüente liberação de neuropeptídeos pró-inflamatórios, como CGRP, SP, Neurocinina A (NK-A), Peptídeo Vasoativo Intestinal (VIP), entre outros (SCHMELZ & PETERSEN, 2001; STEINHOFF, 2003). A seguir, por um efeito cascata, há ativação inflamatória, vasodilatação, ativação de quimiorreceptores, quimiotaxia de células inflamatórias (MARTINSSON, 1993), prurido e um eritema

característico (*flare*) no local do estímulo, promovendo um rápido início do processo de inflamação tecidual. (KALIL-GASPAR, 2003).

O estudo em pele de ratos tem sido bem caracterizado em termos de nocicepção de respostas a estímulos externos, para determinar sua correlação com a liberação de neuropeptídeos (ONUOHA *et al.*, 2000).

Não foram encontrados estudos que relacionassem a concentração de neuropeptídeos cutâneos, especificamente SP e CGRP, após a injeção de CO<sub>2</sub>. Por se tratar de uma técnica atualmente utilizada na área da saúde, torna-se importante investigar se a vasodilatação causada pela carboxiterapia está relacionada aos neuropeptídeos CGRP e SP, dentre outros, durante a fase de inflamação neurogênica.

**OBJETIVO**

## **2. OBJETIVO**

Investigar a injeção de Dióxido de Carbono na secreção do Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina (CGRP) e da Substância P (SP) em pele de ratos.

**LITERATURA**



### **3. LITERATURA**

Devido à inexistência de estudos relacionados ao assunto, foi realizada a inclusão de artigos que, em conjunto, puderam dar suporte e embasamento ao estudo. Em função disso, o presente capítulo está dividido em dois subcapítulos: 3.1) Neuropeptídeos e 3.2) Dióxido de Carbono.

#### **3.1. Neuropeptídeos**

BRAIN *et al.* (1996) estudaram a farmacologia do neuropeptídeo Peptídeo Relacionado com o Gene de Calcitonina (CGRP), composto por 37 aminoácidos, produzido sobretudo em neurônios sensitivos periféricos, de fibras A- $\delta$  e C, e centrais, do corno posterior da espinha nervosa. É produzido como duas isoformas,  $\alpha$  e  $\beta$ , liberado por terminações nervosas por uma série de estímulos e degradado por triptase e quimase. É um potente vasodilatador por relaxamento arteriolar, independente do óxido nítrico, e tem diversas atividades no processo inflamatório causando edema, ativação de neutrófilos, eosinófilos, linfócitos, células dendríticas entre outras, por receptores CGRP1 e CGRP2. A inflamação neurogênica na dura-máter foi implicada na patogênese da enxaqueca, ideia corroborada pelo fato de que o CGRP é liberado na circulação cerebral durante as crises, podendo contribuir para a vasodilatação e dor associada. Fármacos que atuem como antagonistas do receptor de CGRP, inibindo a inflamação neurogênica, prometem eficácia no tratamento da enxaqueca pela inibição da liberação local de peptídeos vasoativos.

WEIDNER *et al.* (2000) investigaram a Substância P (SP) e o CGRP em pele de humanos quanto à capacidade em promover vasodilatação, extravasamento proteico, liberação de histamina e efeitos sensitivos, utilizando Microdiálise (MD) com Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA). A MD com ELISA permitiu determinar o extravasamento proteico na pele de humanos *in vivo* de maneira atraumática em 53 voluntários saudáveis. Assim, 5 fibras ocas de plasmáfereze foram introduzidas na face volar do terço médio do antebraço esquerdo, perpendiculares ao eixo ósseo, a uma profundidade média de 0,6 mm, distando 4 cm um do outro. As fibras foram perfundidas com solução de Ringer por 60 min e depois foi realizado estímulo com SP e CGRP por 30 min, sendo os resultados comparados com os controles positivos prostaglandina E2 (substância vasodilatadora) e codeína (substância degranuladora de mastócitos). O produto da diálise foi colhido a cada 15 min e enviado para análise fotométrica. Os autores observaram que (1) tanto SP como CGRP não provocaram sintomas locais, como dor e coceira; (2) SP produziu vasodilatação dose-dependente e extravasamento proteico, provavelmente por dilatação de vênulas pós-capilares; (3) CGRP produziu vasodilatação mais duradoura e potente que SP, agindo nas arteríolas pré-capilares, portanto sem extravasamento proteico; e (4) SP provocou liberação de histamina, mas apenas em concentrações mais elevadas.

KUSAKABE *et al.* (2002) investigaram a distribuição e abundância de fibras nervosas imunorreativas para quatro diferentes neuropeptídeos regulatórios, Neuropeptídeo Y (NPY), Polipeptídeo Intestinal Vasoativo (VIP), SP e CGRP, entre o corpo carotídeo de ratos Wistar machos normóxicos e hipóxicos cronicamente hipercápnicos (10% O<sub>2</sub> e 6-7% CO<sub>2</sub>

por 3 meses) e compararam os resultados obtidos com relatos anteriores de corpos carotídeos cronicamente hipóxicos hipocápnicos e isocápnicos a fim de avaliar o efeito dos níveis de PaCO<sub>2</sub>. Os autores verificaram que a vasculatura no corpo carotídeo de ratos hipóxicos cronicamente hipercápnicos estava aumentada em comparação àquela dos ratos controle normóxicos, mas a taxa de aumento vascular foi menor do que a previamente relatada em corpos carotídeos hipóxicos hipocápnicos e isocápnicos. No que concerne CGRP e SP, os autores demonstraram que nos corpos carotídeos hipóxicos cronicamente hipercápnicos a densidade das fibras imunorreativas a SP e CGRP diminuiu. A inervação peptidérgica alterada do corpo carotídeo hipóxico cronicamente hipercápnico seria uma das características da adaptação hipóxica assim como nos corpos carotídeos hipóxicos cronicamente hipocápnicos e isocápnicos.

ROOSTERMAN *et al.* (2006) escreveram um extenso artigo de revisão sobre a pele com órgão neuroimunoendócrino. A inflamação neurogênica (IN) é explicada em detalhes, desde um esquema genérico de liberação antidrômica de neuropeptídeos secundários a um estímulo, até eventos bioquímicos específicos. Ressalta-se (1) o importante papel dos mastócitos na intermediação da resposta em cascata, (2) a função das enzimas que degradam neuropeptídeos, como a Neprilisina (NEP), a Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) e a Enzima Conversora de Endotelina (ECE); (3) os diversos tipos de receptores de NP's nas membranas celulares das células-alvo, todos membros de uma superfamília de receptores acoplados à proteína G (GPCR). Especificamente sobre a SP, (1) ela pode estar associada a doenças cutâneas, como psoríase, dermatite atópica e dermatite de contato; (2) está associada a eventos

imunomodulatórios, inflamatórios e cicatriciais; (3) é capaz de estimular mastócitos a liberar histamina, TNF- $\alpha$ , prostaglandina D<sub>2</sub> e leucotrieno B<sub>4</sub>; (4) é capaz de estimular queratinócitos a liberar interleucinas IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8 e antagonista de IL-1; (5) é capaz de estimular proliferação de fibroblastos; e (6) promove quimiotaxia de neutrófilos, eosinófilos e fibroblastos. Quanto ao CGRP, (1) existem dois tipos, o  $\alpha$ -CGRP e o  $\beta$ -CGRP, diferentes entre si em apenas 1 aminoácido, mas o  $\alpha$ -CGRP é expresso preferencialmente em neurônios sensitivos cutâneos enquanto o  $\beta$ -CGRP é encontrado sobretudo em neurônios entéricos; (2) está associado a eventos imunomodulatórios, inflamatórios e cicatriciais; (3) tem efeitos anti-inflamatórios ao reduzir acúmulo de neutrófilos, (4) é capaz de estimular mastócitos a liberar TNF- $\alpha$ ; (5) é capaz de estimular proliferação de queratinócitos que também liberam IL-1; (6) é capaz de estimular proliferação de melanócitos; (6) promove quimiotaxia de neutrófilos e queratinócitos; e (7) é um dos mais potentes vasodilatadores conhecido, pelo relaxamento de arteríolas, o que causa edema.

ZEGARSKA, LELIŃSKA, TYRAKOWSKI (2006) relataram em estudo realizado que o eritema local é um resultado do reflexo axonal e antidrômico sensitivo induzido por fatores vasodilatadores (SP, histamina, purinas e CGRP). SP influencia a microvasculatura por meio de receptores da Neurocinina-1 (NK-1) e media a liberação de histamina dos mastócitos da pele, o que foi associado a vasodilatação, formação de edema e liberação de mediadores pró-inflamatórios. Os autores discutiram o papel dos nervos na mediação da inflamação cutânea. Informações de descobertas recentes estabeleceram um novo conceito de neurobiologia cutânea, ressaltando que as influências do sistema nervoso central e

periférico, os sistemas endócrino e imune e quase todas as células da pele estão interligados em seu papel funcional na pele. A modulação dos neuropeptídeos está envolvida nesses mecanismos. As descobertas relativas ao mecanismo molecular da ação de neuropeptídeos, especialmente aquelas que explicam o papel dos seus receptores, contribuíram significativamente para uma melhor compreensão da interação na pele, nervos e sistema imunológico durante o processo de IN. Devido a esse conhecimento, é possível determinar novas formas de tratamento de doenças inflamatórias cutâneas associadas ao sistema neuroendócrino.

PETERS *et al.* (2006) consideram a pele um órgão imunitário que protege contra os diferentes desafios ambientais como riscos biológicos, químicos, físicos e a radiação. A imunização cutânea depende da ação das células do sistema imunológico e dos neuropeptídeos liberados pelos nervos cutâneos, nas respostas de reparação tecidual. Neuropeptídeos controlam as funções dos mastócitos e orquestram a IN, sendo que SP e CGRP iniciam o processo de IN. SP é capaz de desencadear a liberação de citocinas, tais como o TNF- $\alpha$ , a partir de mastócitos em uma IN dependente de NK-1, estimulando a migração celular, ativação e citotoxicidade, estimulando a proliferação celular endotelial, contribuindo para a angiogênese, neovascularização e aumento do influxo de células imunes em tecidos inflamados.

CAVIEDES-BUCHELI *et al.* (2008) fizeram um estudo relacionando a função dos neuropeptídeos e da inflamação neurogênica com enfoque na polpa dentária. A IN descreve o componente da inflamação causado por estímulo apropriado em neurônios periféricos, que resulta na liberação de NP's que alteram múltiplos processos no local da

lesão, como permeabilidade vascular e vasodilatação. NP's são peptídeos neurotransmissores ou neuromoduladores estruturalmente mais complexos e com mais sítios de ligação para receptores do que neurotransmissores clássicos, e estão presentes no sistema nervoso central e no sistema nervoso periférico, permitindo que esses sistemas participem da fisiopatologia da inflamação periférica na forma de um componente neurogênico. A SP e o CGRP localizam-se em fibras A- $\delta$  e C e são liberados pelos mesmos estímulos: térmico, mecânico, químico, elétrico, infeccioso, capsaicina, mediadores inflamatórios, bradicinina e prostaglandinas. A SP age sobretudo em receptores NK-1, enquanto o CGRP age sobre receptores CGRP1 e CGRP2, todos os três expressos basicamente nas mesmas células: mastócitos, macrófagos, células mesenquimais, fibroblastos, linfócitos T e B. Os autores complementaram o artigo com informações detalhadas relacionando as funções dos NP's a eventos fisiopatológicos da polpa dentária.

### **3.2. Dióxido de Carbono**

SAVIN *et al.* (1995), em estudo duplo cego randomizado, demonstraram que a carboxiterapia por infusão de CO<sub>2</sub>, permite uma vasodilatação persistente identificada por videolaparoscopia e um aumento significativo da concentração local de oxigênio (O<sub>2</sub>), e que seus efeitos locais não foram acompanhados por alterações hemodinâmicas sistêmicas, sugerindo que a ação da carboxiterapia promova melhora do fluxo sanguíneo, verificado por fluxometria Doppler.

HARTMAN *et al.* (1997) apontaram resultados positivos do tratamento com uso de gás carbônico percutâneo em pacientes com arteriopatia periférica, pela imersão da perna e do pé em água doce e em água enriquecida com dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) (1200 mg de CO<sub>2</sub> por kg de água) com temperatura, 34 °C; profundidade, 35cm, tempo de imersão, 20 min. Houve melhora na claudicação intermitente, com vasodilatação e aumento da pressão parcial de oxigênio (PaO<sub>2</sub>) devido à diminuição local da afinidade da hemoglobina pelo oxigênio, potencializando o efeito Bohr, o que resultou em maior disponibilidade de oxigênio para o tecido.

BRANDI *et al.* (2001) em sua pesquisa com o uso de CO<sub>2</sub> por injeção subcutânea em 48 pacientes (24-51 anos, média de idade: 34 anos), verificaram o aumento da perfusão tecidual, aumento da pressão parcial de oxigênio e redução da circunferência (efeito lipolítico). Realizaram avaliações histopatológicas das áreas tratadas, ficando evidente: aumento da espessura da pele, ruptura da membrana do adipócito e preservação total do tecido conectivo, incluindo-se estruturas vasculares e nervosas. Além disso, os autores demonstraram, em estudo histológico, cortes com rupturas de membranas de adipócitos pela passagem do gás, reforçando o efeito lipolítico da carboxiterapia.

TORIYAMA *et al.* (2002) investigaram os efeitos fisiológicos de banhos enriquecidos com CO<sub>2</sub> e suas consequências na recuperação de membros em pacientes com doença arterial periférica (DAP) e isquemia crítica de membros (ICM) com ulceração ou gangrena (estágio IV da classificação de Fontaine). Oitenta e três membros com ICM (Fontaine IV) de 68 pacientes com DAP foram submetidos a banhos de pé artificialmente enriquecidos com CO<sub>2</sub> (10 min, 2 vezes ao dia, por pelo menos 2 meses),

tendo sido acompanhados por mais de 6 meses. Dos 83 membros tratados, 69 (83,1 %) puderam ser salvos. Vinte e sete de 28 (96,4 %) que apresentavam úlcera e gangrena em apenas um dedo, 13/16 membros (81,2 %) em vários dedos e 29/39 membros (74,4 %) em todos os dedos e/ou calcanhar, respectivamente, foram salvos. Os autores concluíram que os efeitos da água enriquecida com CO<sub>2</sub> na microcirculação subcutânea poderiam ser devido à vasodilatação periférica refletida pela atividade parasimpática elevada e simpática diminuída e que o banho de pé enriquecido com CO<sub>2</sub> é clinicamente eficiente na recuperação de membros com ICM (estágio IV da classificação de Fontaine).

BRANDI *et al.* (2004) investigaram o efeito da carboxiterapia no tratamento da irregularidade da pele pós-lipoaspiração e na melhora da flacidez cutânea, mostrando eficácia nos resultados. Segundo os autores, o gás carbônico atua na microcirculação vascular do tecido, promovendo uma vasodilatação que promove a drenagem venolinfática. Com isso, promove melhora no fluxo de nutrientes, como a remodelação dos componentes da matriz extracelular e a migração e reparação tecidual. Além da atuação na membrana adipocitária e alteração na curva de dissociação da hemoglobina com o oxigênio (efeito *Bohr*), essa ação lipolítica oxidativa atua diretamente no Fibroedema Geloide (FEG), aumento de viscosidade, estase venulocapilar com hipo-oxigenação e consequente sofrimento do adipócito, levando à lipogênese e hipertrofia.

VAUSE *et al.* (2007) investigaram *in vitro* os efeitos fisiológicos do CO<sub>2</sub> na secreção de CGRP por neurônios sensoriais trigeminiais. Para esse fim, estabeleceram culturas primárias de gânglios trigeminiais de ratas adultas Sprague-Dawley. Os efeitos das alterações de pH extracelulares



versus intracelulares mediadas por  $\text{CO}_2$  na secreção de CGRP e os níveis intracelulares de cálcio e pH foram determinados permitindo-se a troca de  $\text{PCO}_2$  enquanto se controlava o pH extracelular, uma condição denominada hipercapnia isoídrica. Os autores observaram que a secreção de CGRP aumentou significativamente em aproximadamente 3 vezes em pH 6,0 e em aproximadamente 4 vezes em pH 5,5 em comparação aos níveis basais, em pH 7,4. Os efeitos da exposição de diferentes meios tamponados a 100% de  $\text{CO}_2$  também foram estudados e os autores perceberam que há uma diminuição gradual do pH em função do tempo, chegando a pH 5,8 após 300 segundos de exposição. Por outro lado, após exposição ao  $\text{CO}_2$ , não houve diminuição de pH no meio isoídrico, que continha bicarbonato e fosfato. Depois de demonstrado que a exposição do meio normal (tamponado) a 100% de  $\text{CO}_2$  causa acidificação, o efeito do  $\text{CO}_2$  sobre a secreção de CGRP foi determinado. O tratamento de culturas de 1 dia de gânglios trigeminiais por 1 hora com estímulo despolarizante (60 mM KCl) provocou um aumento de 5 vezes na liberação de CGRP em relação às culturas-controle não tratadas. Em seguida, para estabelecer se o  $\text{CO}_2$  poderia inibir a secreção de CGRP estimulada por agentes anti-inflamatórios conhecidos, as culturas trigeminiais foram tratadas com capsaicina ou com o doador de Óxido Nítrico (NO), Sinaptolisina (SNAP). Em meio isoídrico, a capsaicina (2  $\mu\text{M}$ ) estimulou CGRP a níveis quase 5 vezes acima dos basais e a SNAP (1 mM) elevou a secreção de CGRP cerca de 3 vezes. Entretanto, em culturas expostas a 100% de  $\text{CO}_2$ , durante 5 minutos, os efeitos estimulantes da capsaicina e SNAP foram significativamente reprimidos, ficando próximos dos níveis basais. Os autores concluíram que o  $\text{CO}_2$  é capaz de inibir a liberação de CGRP pelos neurônios trigeminiais em resposta a três diferentes estímulos, KCl, capsaicina e NO. Concluíram ainda que os efeitos inibitórios do  $\text{CO}_2$  na

secreção do CGRP são provavelmente mediados pela inibição da atividade dos canais de cálcio e subsequente elevação do cálcio intracelular, além de alterações do pH intracelular.

CASALE, ROMERO, SPIERINGS (2008), considerando que CO<sub>2</sub> intranasal pode inibir a ativação neuronal trigeminal e suprimir a liberação de CGRP, investigaram se o CO<sub>2</sub> inalado por via intranasal seria eficaz no tratamento da Rinite Alérgica Sazonal (SAR). O estudo foi realizado em centro único, aleatório, duplo-cego, controlado por placebo e com grupo paralelo. O tratamento consistiu de CO<sub>2</sub> ou ar (placebo) em uma proporção de 2:1, administrados em cada narina por 60 segundos, a uma taxa de fluxo de 10 mL/s. Participaram do estudo 89 pacientes entre 18 e 75 anos de idade, com história de pelo menos 2 anos de SAR necessitando farmacoterapia. Os pacientes selecionados responderam positivamente ao teste cutâneo por *prick* (picada) com uma pápula de pelo menos 3 mm de diâmetro a mais do que o controle, tendo sido utilizados alérgenos sazonais de grama ou mofo prealentes em Omaha, Nebraska, em maio de 2005. Dos 89 pacientes, 60 receberam CO<sub>2</sub> e 29 receberam placebo/ar, e todos completaram o estudo. O desfecho primário de eficácia foi a alteração a partir da linha basal do escore total de sintomas nasais (TNSS), a soma do congestionamento, coriza, coceira e espirros foi pontuada em uma escala de 0 a 5 pontos, após 30 minutos. O CO<sub>2</sub> resultou em uma melhora estatisticamente significativa no TNSS (CO<sub>2</sub> x placebo) aos 30 minutos em relação ao placebo (alterações absolutas de 5,0 para o CO<sub>2</sub> e de 2,2 para o placebo,  $P = 0,00019$ ). A melhora em relação ao valor basal do TNSS (CO<sub>2</sub> x placebo) foi estatisticamente significativa aos 10 minutos e manteve-se assim por 24 horas. Os autores concluíram que dois tratamentos intranasais

de CO<sub>2</sub> de 60 segundos resultaram em alívio rápido (10 minutos) e sustentado (24 horas) dos sintomas de rinite alérgica sazonal.

BRANDI *et al.* (2010) relataram os resultados clínicos e instrumentais da aplicação de CO<sub>2</sub> no tratamento de feridas crônicas em 70 pacientes (45 homens, 25 mulheres; 45-75 anos, média de idade: 66 anos) portadores de úlceras crônicas nos membros inferiores. Os pacientes, provenientes da Unidade de Cirurgia Plástica do Hospital Universitário de Siena, Itália, foram selecionados por etiologia associada (arteriopatia periférica, insuficiência venosa crônica, diabetes tipo I e diabetes tipo II) e por extensão da ferida e divididos aleatoriamente em dois grupos homogêneos. As lesões cutâneas tinham evolução média de 12 meses (faixa de 4-24 meses). No grupo A, a terapia com CO<sub>2</sub> foi empregada adicionalmente aos métodos de rotina de tratamento dessas lesões (desbridamento químico ou cirúrgico, curativos avançados segundo as características de cada lesão), 2 vezes por semana por um período de 6 semanas, iniciando no primeiro dia de tratamento das lesões. No grupo B, apenas os métodos de rotina foram empregados no tratamento das lesões. As úlceras foram consideradas como cicatrizadas quando constatada a reepitelização. Nos demais casos, o estudo foi conduzido (utilizando apenas curativos em ambos os grupos) por um período de 60 dias, ao fim do qual a variação percentual no tamanho da lesão foi medida e registrada utilizando-se um *grid* transparente milimetrado. Ambos os grupos foram submetidos a avaliação instrumental (fluxometria laser Doppler, medições de TcPO<sub>2</sub>), clínica e fotográfica. No grupo submetido a terapia com aplicação subcutânea de CO<sub>2</sub>, os resultados evidenciaram um aumento significativo nos valores de oxigenação dos tecidos, o que foi confirmado pelo maior progresso das lesões tanto em termos de cicatrização quanto de redução da

área lesionada. As análises de TcPO<sub>2</sub> no grupo A mostraram um aumento nos valores médios de 21,55 para 41,18 mmHg ( $p < 0,001$ ), enquanto no grupo B a média aumentou de 22,15 para 32,54 mmHg, sem valores  $p$  estatisticamente significantes. O tempo médio de cicatrização no grupo A foi de 25 dias contra 37 dias no grupo B. Todos os pacientes continuaram o tratamento e monitoramento, mesmo após cicatrização, até o sexagésimo dia, para estabilização dos resultados e estudo das reações locais de microcirculação. Nos pacientes cujas feridas não cicatrizaram até o sexagésimo dia (grupo A: 10 pacientes; grupo B: 17 pacientes), o percentual médio de redução do tamanho da ferida foi de 85 % no grupo A e 60 % no grupo B. Levando-se em consideração a segurança, eficácia e confiabilidade desse método, mesmo sendo necessários mais estudos, os autores acreditam que valha a pena incluir a terapia com aplicação subcutânea de CO<sub>2</sub> no tratamento de feridas que envolvam danos relacionados a hipóxia.

NACH *et al.* (2010) relatam o uso da carboxiterapia para melhora de cicatrizes em uma paciente de 60 anos de idade. A paciente tinha como queixa principal, cicatrizes ao longo de uma incisão submentoniana e de uma incisão pré-auricular direita realizadas 5 anos antes durante um procedimento de ritidoplastia. O exame revelou marca dos pontos ao longo das cicatrizes, hipertrofia e eritema da incisão submentoniana e alargamento da incisão pré-auricular. Foi realizado tratamento com 10 sessões de carboxiterapia administrados com 1 a 2 semanas de intervalo, com resultados satisfatórios e visível melhora. Os autores consideram a carboxiterapia um excelente complemento ao arsenal dos cirurgiões plásticos devido à sua relativa ausência de toxicidade, facilidade de uso e predizibilidade de resultados.

## **MÉTODOS**

## **4. MÉTODOS**

### **4.1. Desenho do Estudo**

O presente estudo é primário, intervencional, experimental, aleatorizado, unicego e controlado.

O projeto de pesquisa foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP sob o protocolo nº 1695/10 (Apêndice 1).

### **4.2. Local do Estudo**

Os procedimentos experimentais foram realizados no Laboratório de Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia da Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo.

### **4.3. Amostra**

Foram utilizados 56 ratos Wistar-EPM (*Rattus norvegicus*) adultos, machos, com peso entre 250 e 350 gramas, com idade de oito semanas, oriundos do Biotério Central do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia (CEDEME) da Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Os procedimentos cirúrgicos experimentais foram realizados no Laboratório de Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia da Escola Paulista de Medicina(EPM). Os animais foram confinados em gaiolas individuais de plástico, com tampa metálica própria para dispor o recipiente com água e ração comercial, a serem consumidas *ad libitum*. O ambiente foi mantido,

por meio de dispositivos eletrônicos, a uma temperatura constante de  $22 \pm 1$  °C, manutenção do grau de umidade e de um ciclo claro/escuro de 12 horas de luz. Os animais tiveram o período de 1 (uma) semana para ambientação antes da manipulação experimental.

#### 4.4. Delineamento Experimental

Os animais foram pesados e distribuídos aleatoriamente ([www.randomization.com](http://www.randomization.com)) em 4 subgrupos de 7 ratos, para cada tipo de neuropeptídeo, sendo 28 animais para CGRP, sendo distribuídos em pró-CGRP (15 kDa) e CGRP (5 kDa) para análise e 28 para SP, como se segue:

##### **Grupo CGRP**

**Subgrupo 1 CGRP-Controle:** os animais foram submetidos à tricotomia e após 1 hora, foram demarcados com *punch* cirúrgico de 4 mm na metade da reta A. As amostras de pele parcial foram retiradas com dermatomo elétrico com espessura de 500 µm, sendo padronizados o tamanho e formato da amostra.

**Subgrupo 2 CGRP-Controle agulha:** os animais deste subgrupo foram submetidos à tricotomia e após 1 hora receberam a perfuração com a agulha hipodérmica 30 G, 0,30 x 4 mm, na metade da reta A, com angulação de 90°. Foram demarcados com *punch* cirúrgico de 4 mm sobre a área da perfuração da agulha, sendo as amostras de pele parcial retiradas

com dermatômetro elétrico com espessura de 500 µm, padronizando o tamanho e formato da amostra.

**Subgrupo 3 CGRP-CO<sub>2</sub>**: os animais deste subgrupo foram submetidos à tricotomia e após 1 hora receberam a injeção de Dióxido de Carbono com fluxo de 80 ml/min, durante 10 segundos, totalizando um volume de 8 ml, com a agulha hipodérmica 30 G, 0,30 x 4 mm, na metade da reta A, com angulação de 90° graus. Foram demarcados com *punch* cirúrgico de 4 mm sobre a área da perfuração da agulha, em seguida foram retiradas as amostras de pele parcial com dermatômetro elétrico, com espessura de 500 µm, padronizando o tamanho e formato da amostra.

**Subgrupo 4 CGRP-ar atmosférico** : os animais deste subgrupo foram submetidos à tricotomia e após 1 hora receberam a injeção de Ar Atmosférico com fluxo de 80 ml/min, durante 10 segundos, totalizando um volume de 8 ml, com a agulha hipodérmica 30 G 0,30 x 4 mm, na metade da reta A, com angulação de 90° graus. Foram demarcados com *punch* cirúrgico de 4 mm sobre a área da perfuração da agulha, em seguida foram retiradas as amostras de pele parcial com dermatômetro elétrico, com espessura de 500 µm, padronizando o tamanho e formato da amostra.

### **Grupo SP**

**Subgrupo 1 SP-Controle**: os animais foram submetidos à tricotomia e após 1 hora, foram demarcados com *punch* cirúrgico de 4 mm na metade da reta A, e retiradas as amostras de pele parcial com dermatômetro elétrico com espessura de 500 µm, padronizando o tamanho e formato da amostra.

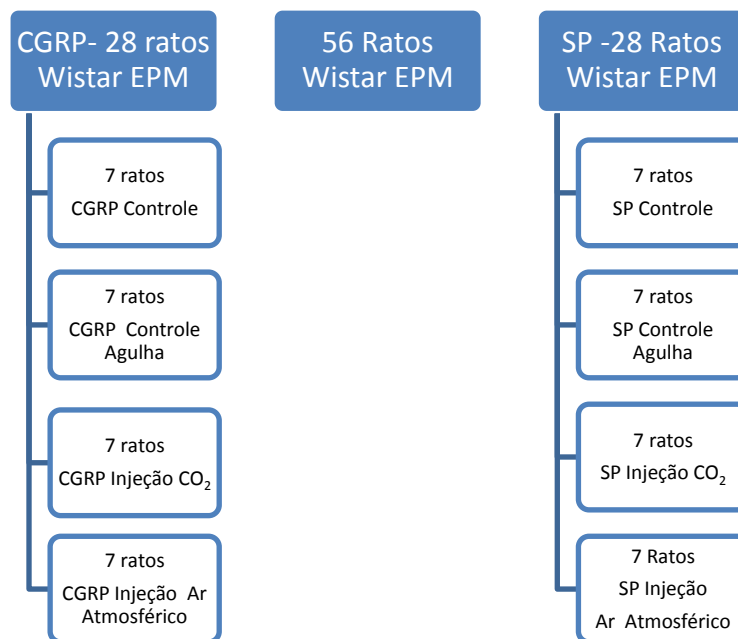
**Subgrupo 2 SP-Controle agulha**: os animais deste subgrupo foram submetidos a tricotomia e após 1 hora receberam a perfuração com a agulha hipodérmica 30 G , 0,30 x 4 mm, na metade da reta A, com angulação de 90° graus. Foram demarcados com *punch* cirúrgico de 4 mm



sobre a área da perfuração da agulha e retiradas as amostras de pele parcial com dermatômetro elétrico com espessura de 500  $\mu\text{m}$ , padronizando o tamanho e formato da amostra.

**Subgrupo 3 SP -CO<sub>2</sub>:** os animais deste subgrupo foram submetidos a tricotomia e após 1 hora receberam a injeção de Dióxido de Carbono com fluxo de 80 ml/min, durante 10 segundos, totalizando uma volume de 8 ml, com a agulha hipodérmica 30 G, 0,30 x 4 mm, na metade da reta A, com angulação de 90° graus. Foram demarcados com *punch* cirúrgico de 4 mm sobre a área da perfuração da agulha, em seguida foram retiradas as amostras de pele parcial com dermatômetro elétrico, com espessura de 500  $\mu\text{m}$ , padronizando o tamanho e formato da amostra.

**Subgrupo 4 SP-ar atmosférico:** os animais deste subgrupo foram submetidos a tricotomia e após 1 hora receberam a injeção de Ar Atmosférico com fluxo de 80 ml/min, durante 10 segundos, totalizando uma volume de 8 ml, com a agulha hipodérmica 30 G 0,30 x 4 mm, na metade da reta A, com angulação de 90° graus. Foram demarcados com *punch* cirúrgico de 4 mm sobre a área da perfuração da agulha, em seguida foram retiradas as amostras de pele parcial com dermatômetro elétrico, com espessura de 500  $\mu\text{m}$ , padronizando o tamanho e formato da amostra.



**FIGURA 1 – Distribuição dos grupos.**

Distribuição dos animais do experimento, sendo 7 animais para cada subgrupo pertinente à pesquisa.

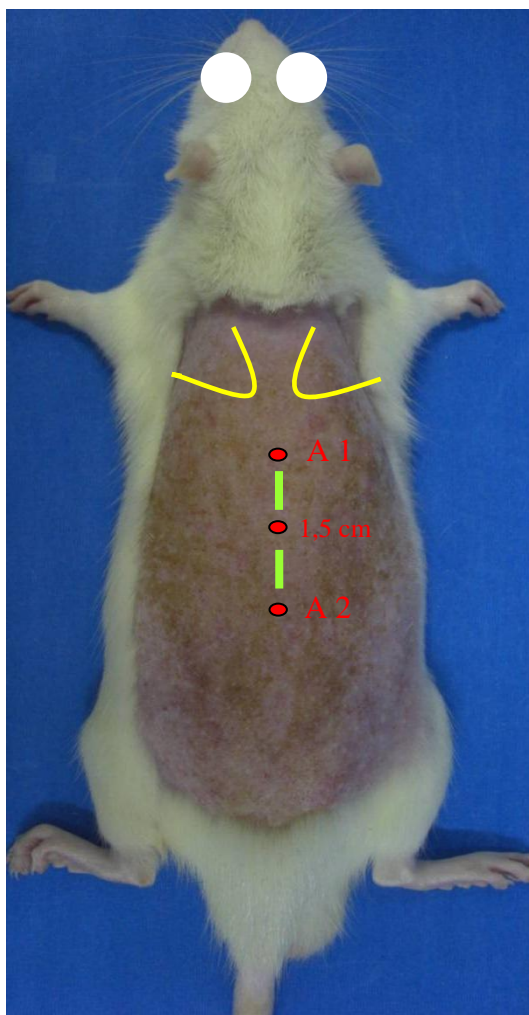
## 4.5. Procedimentos Experimentais

### 4.5.1. Anestesia

Os animais foram submetidos à anestesia geral por via intramuscular, utilizando-se cloridrato de xilazina (50 mg/kg) e quetamina (100 mg/kg), de uso veterinário, misturados na proporção de 1:2, respectivamente, e injetados (1 ml/kg) no músculo gastrocnêmio direito, Após a indução anestésica, os animais foram dispostos em decúbito ventral e foi realizada depilação com tricótomo elétrico (WAHL<sup>®</sup>) no dorso do rato.

Após tricotomia, foram demarcados em cada animal, por meio de caneta dermográfica, com o cuidado de que a tinta da caneta não fique marcada ao longo dessa reta, 2 pontos (A1 e A2) representando um

segmento “A”, localizado na linha mediana dorsal, 2 cm inferior à linha transversa do ângulo inferior das escápulas, com marcação no intervalo de 1,5 cm a partir da linha mediana dorsal para a aplicação dos procedimentos experimentais.



**FIGURA 2 – Determinação do ponto da injeção dos gases.** Marcação do segmento de reta A pelos pontos A1 e A2. Dorso de rato depilado (escápulas em amarelo). Pontos A1 e A2 (vermelho), marcados com caneta dermográfica ao longo de uma reta A de 3 cm (não marcada com caneta).

Após a anestesia e a demarcação do segmento A, os animais do Subgrupo G2 foram submetidos somente à introdução total de agulha hipodérmica (agulha descartável 30 G, 0,30 x 4 mm), com angulação de 90° no ponto que compreende a metade da distância entre o ponto A1 e A2 (1,5 cm) da reta A de 3 cm, e os animais do Subgrupos G3 e G4 foram submetidos à injeção de dióxido de carbono e /ou ar atmosférico com pressão de 80 ml/minuto durante 10 segundos, em um único ponto e em dose única, utilizando uma agulha hipodérmica, descartável, sendo uma para cada animal (30 G, 0,30 x 4 mm). A aplicação da agulha manteve uma angulação de 90° em relação ao tecido nos subgrupos experimentais G2, G3 e G4, para os animais do grupo que foram avaliados quanto aos neuropeptídeos SP, respeitou-se um tempo de espera para a eutanásia e retirada de pele de 14 minutos e para o grupo que foram avaliados quanto aos neuropeptídeos CGRP, o tempo de espera para a eutanásia e retirada de pele foi de 21 minutos, seguindo resultados do estudo piloto realizado previamente ao estudo.



**FIGURA 3 – Injeção dos gases.**  
Punctura da agulha a 90° e injeção dos Gases CO<sub>2</sub> e Ar atmosférico.

#### 4.6. Exérese da Amostra

Para exérese da amostra, todos os animais foram submetidos à morte assistida indolor por hiperdosagem anestésica (5 vezes a dose posológica), seguida de secção dos grandes vasos cervicais.

No Grupo G1, a amostra de pele parcial foi retirada 60 minutos após a realização da tricotomia (tempo de espera dos animais de todos os subgrupos para a realização dos procedimentos experimentais). No entanto, nos subgrupos G2, G3 e G4, além do intervalo de 60 minutos após a tricotomia para o início da realização dos procedimentos experimentais, as amostras de pele foram retiradas 21 minutos após o término dos procedimentos experimentais para quantificação de CGRP e 14 minutos para quantificação de SP.

Com o rato já morto, o animal foi firmemente seguro nas suas extremidades caudal e cranial, de modo a manter a pele do dorso esticada e expor a região demarcada pela reta A, pois sendo o dermatomo uma estrutura plana e pesada, seu manuseio demanda alta precisão e firmeza, exigindo a tração da pele do animal, a fim de utilizar a coluna vertebral do mesmo como apoio. Antes da retirada da pele parcial foi utilizado um *punch* cirúrgico de 4 mm (Figura 6) na metade da reta A (1,5 cm do ponto A1 para o A2), que corresponde a área de pele marcada pela perfuração da agulha, dos subgrupos G2, G3 e G4, permitindo a obtenção de um fragmento de pele, com espessura constante e formato idêntico.

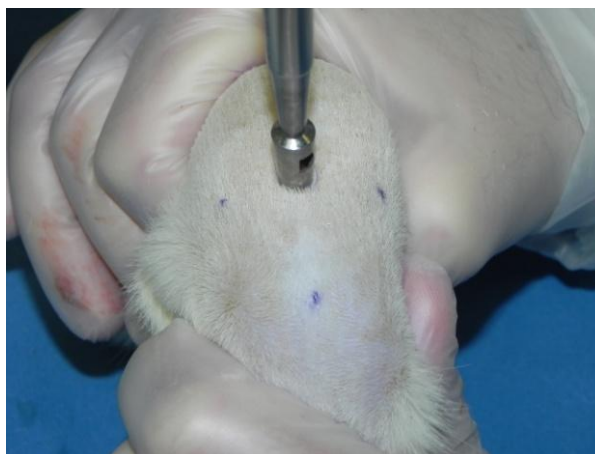
Utilizando-se em seguida um dermatomo elétrico (Padgett®) (Figura 4), foi retirada uma peça de pele parcial do dorso do rato, com espessura de

500  $\mu\text{m}$ , contendo em seu centro a área demarcada pelo *punch* de 4 mm, com no mínimo 1 cm de distância das suas margens (Figuras 4 e 5).



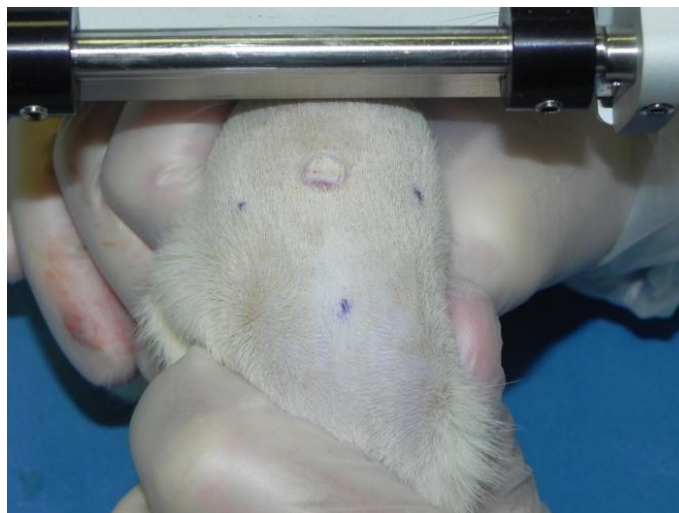
**FIGURA 4 – Expansão da pele.**

Pele do animal expandida pelos Gases  $\text{CO}_2$  e Ar atmosférico.



**FIGURA 5 – Posição do *punch*.**

Demarcação com *punch* cirúrgico de 4 mm para retirada de pele parcial.

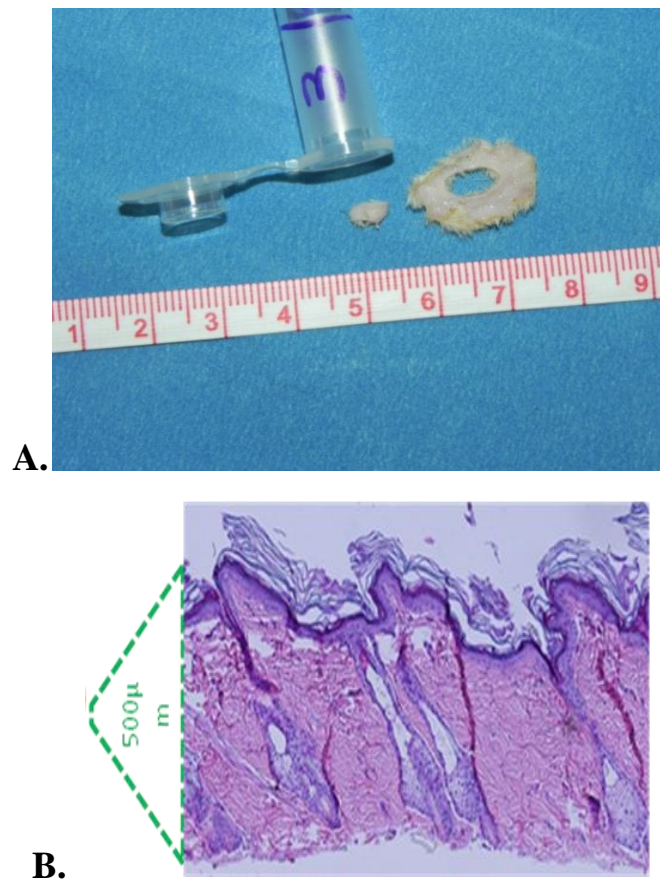
**FIGURA 6 – Dermátomo elétrico.**

Apresentação do dorso do animal e retirada de pele total com Dermátomo Elétrico.

**FIGURA 7 – Pele parcial retirada.**

Após a retirada de pele para análise, já com o círculo demarcado pelo *punch* cirúrgico de 4 mm.

As amostras retiradas foram imediatamente colocadas em tubos *Eppendorf* secos, previamente catalogados com numeração aleatória. Esses tubos foram congelados em gelo seco e mantidos em freezer a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  até o *Western Blotting*.



**FIGURA 8 A e B – A. Amostra de pele padronizada.**

Amostra de pele retirada do centro da reta A (após o *punch*), resultando em um fragmento de pele parcial, com forma circular e espessura de 500 μm, para análise. Mantida em tubo *Eppendorf* para envio para análise por *Western Blotting*. **B.** Fotomicrografia das amostras corada em HE (10 x), mostrando espessura constante.



#### 4.7. Extração de Proteínas por *Western Blotting*

Os fragmentos retirados de cada animal foram homogeneizados em solução tampão para extração da proteína total. Primeiramente, os fragmentos foram lisados e homogeneizados, com auxílio de um homogeneizador, utilizando-se 350  $\mu\text{L}$  de tampão de lise constituído por NP40 (1 %), Deoxicolato de Sódio (0,5 %), Dodecilsulfato de Sódio (SDS, 1 %), Ácido Edético (EDTA, 1 mmol/L), Ácido Egtácico (EGTA, 1 mmol/L) e coquetel inibidor de proteases (Sigma, 1 %) em PBS (pH 7,4). Após a homogeneização, os tubos foram centrifugados a 14.000 rpm por 20 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi obtido e a quantidade de proteína foi determinada usando o método de Bradford (BRADFORD, 1976).

As amostras foram diluídas em tampão de lise a fim de se obter 60  $\mu\text{g}$  em 25  $\mu\text{L}$  de tampão, tendo sido desnaturadas a 100 °C durante 3 minutos e aplicadas às canaletas do gel de poliacrilamida a 12 % para fracionamento. Em um dos pocinhos, foram aplicados 5  $\mu\text{L}$  de marcador de peso molecular (Kaleidoscope, pré-corado, Bio-Rad, EUA). O tampão de corrida foi preparado com Trisma (25 mmol/L), Glicina (0,2 mol/L) e SDS (0,1 %), as proteínas foram separadas por aplicação de 100 volts durante 1 hora e 30 minutos.

Após a corrida, as proteínas foram transferidas para membrana de Fluoreto de Polivinilideno (PVDF) (Bio-Rad) utilizando tampão de transferência gelado contendo Trisma (25 mmol/L), Glicina (0,2 mol/L) e Metanol (10 %) durante 1 hora a 100 V.

A membrana foi, então, incubada com solução de bloqueio dos sítios não ocupados durante 15 minutos a temperatura ambiente. A solução de bloqueio foi constituída a base de leite (10 %) em tampão Trisma-Salina

com *Tween-20* (TBS-T) a 0,05 %. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas com os anticorpos primários: anticorpo policlonal anti-Substância P produzido em cabra (1/100, Santa Cruz), e anticorpo policlonal anti-CGRP produzido em coelho (1/300, Sigma), ambos diluídos em leite (3 %) em TBS-T, por 24 horas a 4 °C e agitação constante. Após essa incubação, as membranas foram lavadas por duas vezes em TBS-T por 10 minutos e incubadas com os anticorpos secundários anticabra (1/2.000, GE) e anticoelho (1/10.000, GE), conjugados a uma peroxidase (HRP-conjugado), diluídos em leite (3 %) em TBS-T e incubados por 1 hora em temperatura ambiente.

Após a incubação com os anticorpos secundários, as membranas foram lavadas por duas vezes com TBS-T e uma vez com tampão Trisma-Salina (TBS) durante 10 minutos cada. A reação aconteceu pela incubação com reagente quimioluminescente (*Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus*, ECL kit, Perkinelmer, EUA) durante exatamente 1 minuto. As membranas foram expostas a filme sensível à quimioluminescência (Hyperfilm ECL, Amersham Biosciences) pelo período de 30 segundos a 5 minutos, dependendo do anticorpo, e reveladas conforme instruções do fabricante.

Após revelação dos filmes, as membranas foram lavadas e submetidas a nova marcação com anticorpo contra a beta-actina, uma proteína, a fim de normalizar os valores proteicos. Para isso, as membranas foram incubadas com anticorpo primário contra beta-actina diluído a 1:30.000 (Sigma, EUA) em TBS-T contendo Soroalbumina Bovina (BSA) a 1 % por 1 hora em temperatura ambiente, seguido de duas lavagens com TBS-T por 10 minutos cada e de incubação por 45 minutos à temperatura ambiente, com o anticorpo secundário (anticoelho, HRP conjugado, Amersham) diluído a 1:10.000 em TBS-T com BSA 1 %. Após essas

incubações, as membranas foram lavadas como descrito anteriormente seguidas da reação e revelação do filme (CHADI *et al.*, 2008; ALVES *et al.*, 2011).

Os filmes foram quantificados por densitometria óptica usando um sistema de análise de imagens conforme descrito por CHADI *et al.* (2008).

#### **4.8. Análise Estatística**

As quantidades de SP e CGRP nas amostras de pele foram obtidas em unidades de valores arbitrários, apresentadas como média, desvio padrão e valores máximos e mínimos.

No primeiro momento, optou-se por obter as primeiras hipóteses do estudo relacionadas à quantificação de neuropeptídeos nas diferentes formas de tratamento utilizando-se o gráfico descritivo *Box Plot*.

Depois de estabelecidas as hipóteses, partiu-se para a conclusão de veracidade pelos testes de hipóteses.

Dado que as amostras eram de tamanho 28, ou seja, amostras pequenas, foi realizado o Teste de Kolmogorov Smirnov a fim de verificar sua normalidade. Constatada a não normalidade dos dados, seguiu-se com teste intragrupos pela técnica de Wilcoxon Mann Whitney, que testa amostras não paramétricas, independentes e aleatórias.

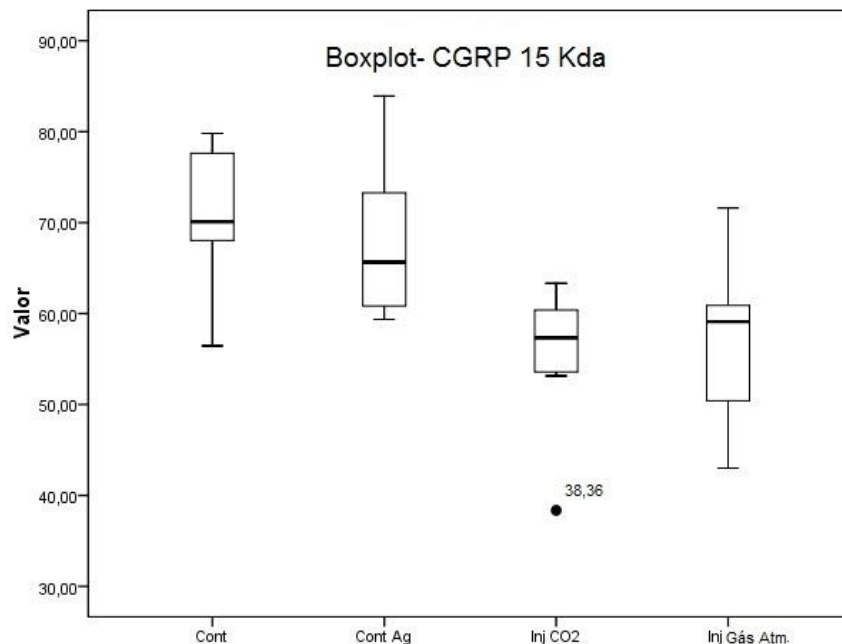
Para todos os testes, foi considerado um nível de significância  $p = 0,05$ .

## **RESULTADOS**

## 5. RESULTADOS

Em relação à secreção do Peptídeo Relacionado com o Gene de Calcitonina (CGRP) 15 kDa (Figura 9) o número de neuropeptídeos do subgrupo Controle (Cont) não diferiu estatisticamente do grupo no qual foi apenas inserida a agulha (Cont Ag). O mesmo aconteceu para os subgrupos nos quais foram injetados CO<sub>2</sub> e Ar atmosférico. Ao mesmo tempo, notou-se uma diferença significativa entre os subgrupos controles e os subgrupos CO<sub>2</sub> e Ar Atmosférico.

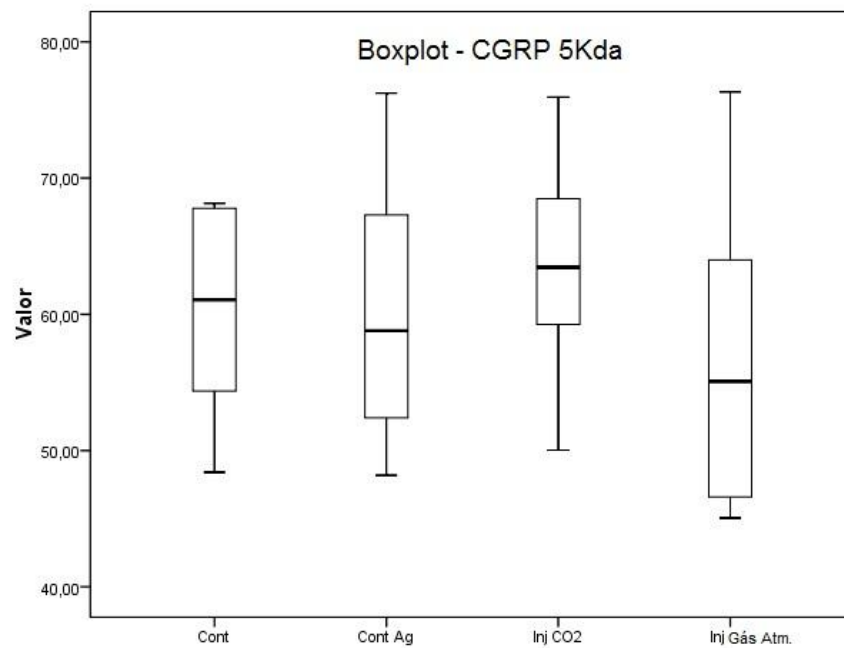
Ainda analisando-se o gráfico, foi constatada a presença de um *outlier* na amostra, que não foi desconsiderado ou recalculado pois não comprometeu o resultado do estudo.



**FIGURA 9 – Gráfico CGRP 15 kDa.**

Quantificação do Neuropeptídeo CGRP 15 kDa por *Western Blotting*.

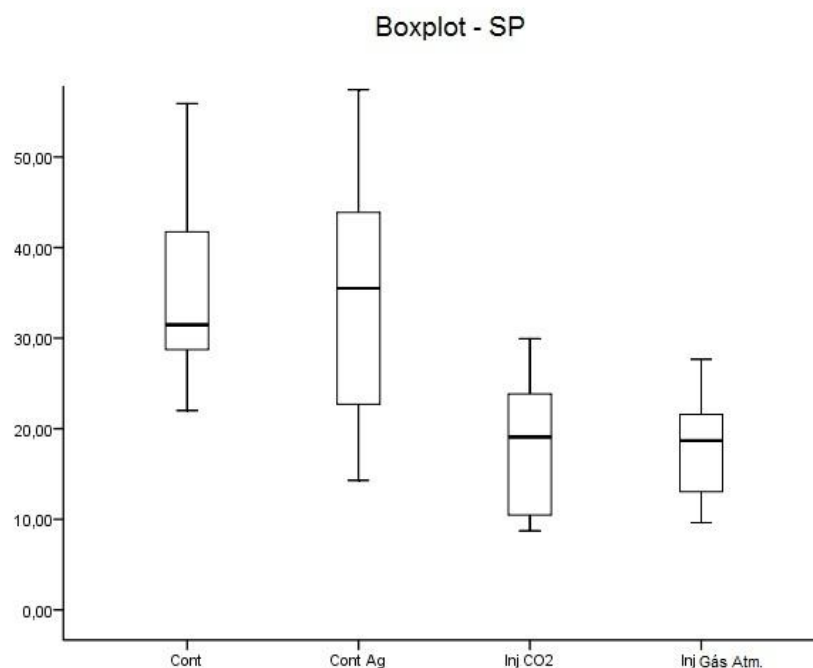
A análise do gráfico de CGRP 5 kDa (Figura 10) mostrou que não houve diferença significativa entre os subgrupos.



**FIGURA 10 – Gráfico CGRP 5 kDa.**

Quantificação do Neuropeptídeo CGRP 5 kDa por *Western Blotting*.

O gráfico referente à Substância P (SP) (Figura 11) mostrou um comportamento semelhantes e hipóteses iguais às descritas para o Grupo CGRP 15 kDa.



**FIGURA 11 – Gráfico SP.**

Quantificação do Neuropeptídeo SP por *Western Blotting*.

Após as primeiras análises, foi aplicado o Teste Kolmogorov Smirnov nos 3 grupos CGRP 15 kDa ( $p=0,976$ ), 5 kDa ( $p=0,907$ ) e SP ( $p=0,848$ ), onde nenhuma das amostras apresentou normalidade de acordo com os p-valores.

Dado o resultado, foi aplicado o Teste Wilcoxon Mann Whitney que compara os subgrupos dois a dois.

Em relação à amostra de CGRP 15 kDa, os únicos métodos que não apresentaram diferença significativa na quantidade de neuropeptídeos foram a injeção de CO<sub>2</sub> em relação à injeção de Ar Atmosférico ( $p= 0,749$ ). O Grupo Controle e o Grupo Controle Agulha mostraram diferença na quantidade de neuropeptídeos quando comparados a todos os outros grupos.

A próxima amostra a ser testada foi a CGRP 05 kDa, não tendo

apresentado diferença estatisticamente significativa na quantidade de neuropeptídeos em nenhum dos tratamentos aplicados.

Para finalizar as análises, testou-se a amostra SP, que não apresentou diferença na quantidade de neuropeptídeos entre os grupos Controle e Controle Agulha ( $p=0,949$ ) e na comparação entre injeção CO<sub>2</sub> e Ar Atmosférico ( $p=0,949$ ).



**DISCUSSÃO**

## 6. DISCUSSÃO

A cicatrização cutânea consiste em um processo complexo envolvendo inflamação, epitelização, angiogênese, formação de tecido de granulação e deposição de matriz extracelular realizados por diferentes tipos de células, como queratinócitos, fibroblastos, células inflamatórias e endoteliais (FERREIRA *et al*, 2009; FERREIRA *et al*, 2010; BROWER & JOHNSON, 2003 ).

A pele possui um Sistema Nervoso Cutâneo (CTNS), ou sistema neurossensorial, considerada como Sistema Neuro-Imuno-Endócrino, principal responsável pelo processo de cicatrização, através de estímulo simpático na inflamação neurogênica e geração de correntes bioelétricas (FERREIRA *et al*, 2009; HOCHMAN, *et al* 2013). Porém, poucos estudos dão ênfase à fase de inflamação neurogênica, sendo este o primeiro evento na fase inflamatória do processo de cicatrização. Os neuropeptídeos presentes nas fibras nervosas da pele desempenham funções autônomas de nocicepção e iniciam uma cadeia de eventos em cascata disparando processos inflamatórios, imunológicos e sensoriais (dor, prurido e vasodilatação ou *flare*). A partir daí, diversas células com receptores específicos para NP's são ativadas, como mastócitos, queratinócitos, fibroblastos, melanócitos, neutrófilos, linfócitos, entre outras e uma diversidade de fatores são liberados, tais como histamina, TNF- $\alpha$ , prostaglandinas, leucotrienos, interleucinas. Também tem início a quimiotaxia de células imunomoduladoras (FERREIRA *et al*, 2009; LIANG *et al.*, 2004; AKAISHI *et al.*, 2008; HOCHMAN *et al.*, 2008; HOCHMAN *et al*, 2013).

Alguns autores mencionam que possíveis falhas nas vias iniciais da inflamação neurogênica possam levar a uma diminuição da velocidade e também na própria qualidade do processo de cicatrização (SMITH *et al.*, 2002; DELGADO, MCMANUS, CHAMBERS, 2005; ROOK & MCCARSON, 2007).

Segundo KALIL-GASPAR (2003), na inflamação neurogênica ocorre vasodilatação arteriolar com formação de pápula com evidente eritema. Segundo o autor, qualquer dano ou estímulo na pele pode desencadear a inflamação neurogênica, sendo que o extravasamento de plasma e a vasodilatação neurogênica podem ser inibidos por um bloqueio no impulso nervoso e sua condução, estabilização de mastócitos, bloqueio de receptores da capsaicina, bloqueio de canais iônicos, com uso de anti-inflamatórios esteroides; pela depleção de neurotransmissores e pela inibição pré-sináptica.

Além disso, CAVIEDES-BUCHELI *et al.* (2008) apontam diversos estímulos que desencadeiam a inflamação neurogênica, como calor, lesões tóxicas, agentes irritantes, alérgenos, luz ultravioleta e agentes microbianos. Já ZEGARSKA, LELIŃSKA, TYRAKOWSKI (2006) demonstram que o estresse mecânico também estimula as fibras sensitivas presentes na pele levando um impulso para processamento medular, o que desencadeia um reflexo axonal com estimulação antidrômica dos nervos sensitivos ao redor do estímulo inicial, levando à liberação de neuropeptídeos pelas terminações nervosas livres da pele, incluindo a Substância P (SP) e o Peptídeo Relacionado com o Gene da Calcitonina (CGRP), ambos essencialmente pró-inflamatórios, apesar do CGRP apresentar também atividades anti-inflamatórias e imunossupressoras (ROOSTERMAN *et al.*, 2006).

Devido à importância desses neuropeptídeos na pele, o presente estudo teve como intuito verificar a influência do Dióxido de Carbono (CO<sub>2</sub>) na liberação desses neuropeptídeos, o que auxilia o esclarecimento dos mecanismos que levam ao aumento da perfusão vascular pelo CO<sub>2</sub>.

Assim, o modelo experimental foi realizado em ratos pela facilidade de busca por resultados em níveis cutâneos. Além disso, a maioria dos estudos existentes utilizou o mesmo animal, o que facilita as comparações dos resultados obtidos, permitindo o desenvolvimento da investigação (KAMI *et al.*, 1985; KUBOTA & OHSHIRO, 1996; KUBOTA, 2002; LIEBANO, FERREIRA, SABINO NETO, 2002; PINFILDI *et al.*, 2005; PRADO *et al.*, 2009; CURY *et al.*, 2009; BOSSINI *et al.*, 2009; COSTA *et al.*, 2010; PRADO *et al.*, 2010).

Para a anestesia foi utilizada a mistura anestésica de cloridato de xilazina (50mg/kg) e quetamina (100mg/kg), pois atua primeiramente na imobilização do animal. Essa combinação, por via intramuscular ou intraperitoneal, é uma das mais utilizadas em animais de pequeno porte, pois pode manter o animal anestesiado por até 60 minutos, com possibilidade de reforço da dose, caso o tempo cirúrgico seja prolongado (SCHANAIDER & SILVA, 2004).

Para a perfeita adequação e reprodutibilidade do método foram suplantadas diversas particularidades, previamente estabelecidas por estudos pilotos, pois os neuropeptídeos possuem estrutura molecular frágil, são facilmente liberados pelas terminações nervosas e têm padrão de disponibilidade na pele e internalização celular pouco estudadas (BRAIN *et al.*, 1996; WEIDNER *et al.*, 2000), portanto, o processo de depilação dos pelos realizada poderia ser um fator determinante de liberação de neuropeptídeos cutâneos, já que a retirada de pelos, seja qual for o método, também implica em microtraumas na pele do animal.

No entanto, não há na literatura estudos que determinem o tempo de degradação dos neuropeptídeos no interstício da pele, o que levou à necessidade de um estudo piloto para determinar em quanto tempo essas substâncias retornam às concentrações fisiológicas na pele após uma depilação. Nesse estudo, ainda não publicado, detectou-se que a SP e o CGRP retornam aos valores basais em até 60 minutos após um estímulo único gerado. Sendo assim, estabeleceu-se um tempo de 60 minutos como padrão para o início do experimento após a depilação, quando as concentrações de ambos os neuropeptídeos já estivessem comprovadamente em níveis fisiológicos. Nem DRUCKER *et al.* (1998) nem RAJKOVIC *et al.* (2005) aguardaram algum período após a depilação, o que poderia representar viés na quantificação de neuropeptídeos na pele.

Em relação à injeção dos gases, foi realizado um estudo piloto para determinar o tempo de maior detecção dos neuropeptídeos SP e CGRP na pele de ratos após injeção de CO<sub>2</sub> e Ar atmosférico, para então realizar a eutanásia e retirada de pele parcial do animal. Foi então estabelecido um tempo de espera específico para cada neuropeptídeo, sendo de 14 minutos para o grupo SP e 21 minutos para o grupo CGRP.

A técnica de injeção de CO<sub>2</sub> foi utilizada, pois tem como efeito final o aumento da microcirculação. Estudos salientam também o aumento parcial da tensão de oxigênio, que tem como consequência, aumento da hipercapnia induzida no fluxo sanguíneo capilar; queda no consumo de oxigênio cutâneo e dissociação de O<sub>2</sub> (efeito Bohr), que é a tendência do oxigênio migrar para área de aumento de concentração de CO<sub>2</sub> (VARLARO *et al.* 2007; e BRANDI *et al.* 2002). Contudo, o CGRP por ser um potente vasodilatador, poderia estar diretamente interligado com os efeitos da injeção de CO<sub>2</sub>.

Para a aplicação de CO<sub>2</sub>, o presente estudo utilizou a técnica de injeção subcutânea, pois em estudo piloto prévio, verificou-se maior promoção da distensão dérmica e menor resistência à punção da agulha do que na técnica de aplicação intradérmica. Isso vai de encontro aos achados de FERREIRA, HADDAD E TAVARES (2008), VARLARO *et al.* (2007) que ressaltam a necessidade de pesquisas futuras para efetuar a comparação entre injeções intradérmicas e subcutâneas, assim como definir o volume de gás utilizado e a frequência de sessões de tratamento.

Já em relação ao fluxo de CO<sub>2</sub>, VARLARO *et al.* (2007) relatam que o limite diário de injeção de CO<sub>2</sub> é de 2000 ml por sessão de carboxiterapia, e normalmente o fluxo médio utilizado para a injeção de CO<sub>2</sub> é de 30-50 ml/minuto e em animais segundo FERREIRA, HADDAD E TAVARES (2008), a pressão utilizada foi de 15 mmHg e velocidade do fluxo de 20 mmHg, mas salientam a necessidade de estabelecer e padronizar o fluxo e a pressão. Porém, diferentemente desses autores, em estudo piloto determinou-se a padronização de um fluxo de 80 ml/minuto durante 10 segundos, em um único ponto utilizando uma agulha hipodérmica à 90° em relação ao tecido.

O modelo experimental utilizou-se da região dorsal do rato, sendo que esta possui uma espessura total de 900 a 1000 µm e os folículos pilosos são abundantes em profundidade maior que 500 µm. Segundo RAJKOVIC *et al.* (2005), as terminações nervosas se concentram na epiderme e na metade superior da derme e os folículos pilosos, por serem ricamente inervados e abundantes em neuropeptídeos, podem mascarar a análise de eventos mais sutis na superfície da pele. Devido a esse fato, o presente estudo utilizou um dermatômetro elétrico para que a pele parcial tivesse uma espessura sempre constante (500 µm) e para que não houvesse diferença de

volume entre as amostras, nem que viessem inadvertidamente acompanhadas de tecido subcutâneo ou panículo carnosos.

A demarcação visual com caneta da área a ser analisada seria conveniente para o experimento, mas um estudo piloto demonstrou que a tinta das canetas dermatográficas, ao pigmentar as camadas superficiais da derme, interfere no método de quantificação dos neuropeptídeos na placa de gel do *Western Blotting* (WB). Além disso, devido à especificidade do WB as amostras tiveram volumes homogeneizados e padronizados, utilizando um *punch* cutâneo, para definir a área de retirada de pele parcial. Essas amostras foram retiradas sobre o ponto de injeção da agulha hipodérmica, exatamente no centro da reta A de 3 cm, já que essa era a origem do estímulo para liberação de neuropeptídeos.

Em sequência a essas padronizações, foi realizada a quantificação de neuropeptídeos na pele pelo método de WB por ser um método viável para detecção de neuropeptídeos na pele, com alta sensibilidade e especificidade, reprodutibilidade e acessibilidade técnica e econômica. No entanto, por se tratar de uma técnica demorada e com várias etapas de execução, o autor acredita que o WB tem aplicação prática dificultada, principalmente quando se emprega número de amostras significativo. Por isso, sua utilização costuma ser restrita aos trabalhos de pesquisa, em detrimento de outras metodologias mais rápidas e de fácil execução, como a imunistoquímica (IHQ). A técnica de WB utilizada neste estudo contornou sua principal desvantagem que é a dificuldade técnica decorrente da extração proteica de um tecido de alta densidade como a derme. Tais limitações foram contornadas adaptando-se as técnicas clássicas de WB com (1) manipulação específica das amostras, com séries de congelamentos e descongelamentos, maceração mais cuidadosa e uso de homogeneizador mais potente; (2) utilização de reagentes de lise em proporções maiores; (3)

inibição de proteases em proporções maiores; e (4) utilização de meios de transferência proteica específicos para a pele, como a membrana de Fluoreto de Polivinilideno (PVDF), já que a membrana habitual de nitrocelulose não foi eficaz.

Embora a imunoistoquímica (IHQ) seja frequentemente adotada como método de quantificação (RAJKOVIC *et al.*, 2005), trata-se, no entanto, de um método de quantificação indireta operador-dependente e pode apresentar significativa variabilidade interexaminadores e imprecisão de resultados (MANDARIM-DE-LACERDA, 2003; RAJKOVIC *et al.*, 2005). Os marcadores fluorescentes, como a fluoresceína isotiocianato (FITC), foram os primeiros a ser utilizados, demonstrando a localização de neuropeptídeos em fibras nervosas que, em cortes espessos, permite observar o trajeto sinuoso das fibras. No entanto, a marcação não é permanente e a maioria dos marcadores tende a perder sua fluorescência num curto período de tempo, principalmente sob a ação da luz, dificultando a documentação de lâminas pela fotografia microscópica.

Além disso, tecidos fixados em formalina tendem a ser autofluorescentes, e, quando contêm catecolaminas, podem ser induzidos a emitir fluorescência específica de cor aproximada à emitida pela fluoresceína. A IHQ presta-se bem a informações qualitativas, contudo alguns autores desenvolveram métodos para sua quantificação, automatizados ou não, que permitem comparações (HENDERSON *et al.*, 2011). Entretanto, a maior limitação da IHQ como método quantitativo é a impossibilidade de fazer as marcações-controle de inespecificidade nas mesmas amostras (secções do tecido) submetidas às marcações em questão e o controle quantitativo do *background*.

Outros estudos utilizam um método de quantificação da secreção de neuropeptídeos no interstício da pele pela técnica de Microdiálise (MD)



seguida de quantificação por Ensaio de Imunoadsorção Enzimática (ELISA) (WEIDNER *et al.*, 2000). A MD é um processo onde cateteres de entrada e de saída são introduzidos na derme com um espaçamento entre si. As substâncias do interstício são, então, captadas e esse lavado é encaminhado para quantificação proteica por ELISA (FUJII *et al.*, 2010). As vantagens desse método são a quantificação direta, de significativa acurácia, em valores absolutos, com unidades em molar e precisão digital de um leitor específico. Como desvantagens, a MD é tecnicamente complexa e trabalhosa, além de trazer alguns vieses devido à necessidade de cateteres inseridos na pele, que por si só poderiam estimular a liberação de substâncias inflamatórias e imunológicas, como histamina, serotonina, prostaglandinas, NGF além de neuropeptídeos (ROOSTERMAN *et al.*, 2006). A utilização do ELISA também é dispendiosa devido ao alto preço dos anticorpos primários e secundários.

Já a técnica de radioimunoensaio (RIE) também foi utilizada para detecção de neuropeptídeos em trabalhos científicos na pele (CAVIEDES-BUCHELI *et al.*, 2009). O RIE é um método preciso, específico e relativamente barato. No entanto, seu uso é restrito devido à necessidade de marcadores radioativos que requerem precauções especiais de instalações, manuseio e licença.

Por outro lado, O WB não distingue a localização do neuropeptídeo dentro da amostra, isto é, não é possível dizer se ele está dentro de vesículas nas terminações nervosas ou se já foi excretado e encontra-se no meio intersticial, ou mesmo se já foi internalizado na célula-alvo. Outros métodos seriam capazes de fazer essa distinção precisamente, sobretudo a MD onde apenas o lavado intersticial é analisado e marcado pelo ELISA (WEIDNER *et al.*, 2000). Estudos onde a posição exata do neuropeptídeo é de extrema importância podem se beneficiar mais de MD com ELISA do

que com o método empregado, por isso nenhum método deve ser considerado ideal. O WB permite a análise quantitativa e segura dos neuropeptídeos, pois possibilita a retirada dos valores do *background* do filme e a normatização dos valores específicos do marcador em questão, em cada amostra, pelos valores de um marcador estrutural, no caso a beta-actina.

Segundo MISHIMA *et al.* (2011), o CGRP é produzido no corpo celular do neurônio do gânglio da raiz dorsal pela transcrição do gene da calcitonina/CGRP, onde uma molécula precursora com 15 kDa, denominada pró-CGRP, é sintetizada no retículo endoplasmático e processada no Complexo de Golgi. O pró-CGRP é levado por via axonal, em sentido antidrômico, para as terminações livres cutâneas sendo clivado em CGRP (forma ativa), com aproximadamente 5 kDa, para ser liberado no interstício diante de um estímulo local. MISHIMA *et al.* (2011) avaliaram a influência do CGRP na revascularização de membros isquêmicos em ratos, e quantificaram o pró-CGRP para comprovar a liberação e aumento de produção de CGRP durante os dias do experimento. O presente estudo demonstrou uma completa depleção dos níveis de pró-CGRP na pele, o que sugere clivagem desse precursor e liberação do CGRP na pele.

O CGRP é comprovadamente um vasodilatador muito eficaz, como demonstrado por ESTEVES, FERREIRA, LIEBANO (2009), que comprovaram seus efeitos no aumento da viabilidade de retalhos cutâneos em ratos. Esse efeito se deve provavelmente ao aumento de perfusão do retalho por dilatação duradoura das arteríolas pré-capilares, o que aumentaria o fluxo sanguíneo e a perfusão tecidual, no entanto sem provocar extravasamento plasmático (WEIDNER *et al.*, 2000). Além disso, o CGRP comprovadamente potencializa os efeitos e a disponibilidade da SP ao inibir sua degradação pela Neprilisina (NEP) (ZEGARSKA,

LELIŃSKA, TYRAKOWSKI, 2006); tem efeitos anti-inflamatórios ao reduzir acúmulo de neutrófilos e promover apoptose de linfócitos T (SMITH *et al.*, 2002); e modula a liberação e quimiotaxia de substâncias e células pró-inflamatórias, respectivamente (ROOSTERMAN *et al.*, 2006). No entanto sua ação direta sobre a cicatrização é discutível e contraditória entre os artigos da literatura (SMITH *et al.*, 2002; ROOSTERMAN *et al.*, 2006; ZEGARSKA, LELIŃSKA, TYRAKOWSKI, 2006; LEFFLER *et al.*, 2008).

Outros meios químicos e físicos também parecem influenciar a secreção de NP's. RAJKOVIC *et al.* (2005) investigaram a influência de campos magnéticos sobre a liberação de NP's na pele e não observaram diferença estatística pela quantificação indireta por IHQ. Considerando as limitações desse método de quantificação, os autores relataram uma secreção menor de SP e uma secreção maior de CGRP nas amostras após o estímulo por campos magnéticos.

A inflamação neurogênica está envolvida nos processos fisiológicos e patológicos da cicatrização; por isso, a possibilidade de modular suas fases iniciais, atrasando-a, inibindo-a, ou estimulando-a, traria a perspectiva de controlar tais processos, eventualmente otimizando o tempo de cicatrização normal e corrigindo as cicatrizações patológicas.

Na área da clínica, doenças cutâneas de origem neuropeptidérgica, como psoríase e dermatites atópicas, e o quelóide (AKAISHI *et al.*, 2008) poderiam se beneficiar de um complemento terapêutico pela modulação da secreção de neuropeptídeos, visando um melhor controle dessas patologias além do tratamento clássico atual.

Em relação ao CGRP (forma ativa – 5 kDa), no presente estudo, nenhum dos grupos experimentais foi capaz de inibi-lo na pele.

Paralelamente, o pró-CGRP (15 kDa) foi inibido em todos os grupos testados. A interpretação desses dados remonta à fisiologia do CGRP.

Os resultados do presente estudo mostram que as injeções de Dióxido de Carbono e de Ar Atmosférico promoveram uma diminuição na quantidade de neuropeptídeos nos subgrupos pró-CGRP e SP, corroborando com os achados de VAUSE *et al.* (2007), que concluíram que o CO<sub>2</sub> é capaz de inibir a liberação de CGRP pelos neurônios trigeminiais.

### **6.1. Perspectivas**

Portanto, merecem destaque nas perspectivas, o uso clínico do Dióxido de Carbono, conhecido como técnica de Carboxiterapia, de forma criteriosa, séria, com crivo científico, visando o conhecimento dos eventos fisiológicos desencadeados pelo uso dessa técnica, que envolvem alterações na inflamação neurogênica. Segundo estudo de revisão sistemática de FERREIRA *et al.* (2012), a carboxiterapia ainda não alcançou evidência científica que assegure sua efetividade e segurança para a indicação de seu uso na prática clínica, mesmo que os estudos clínicos existentes relatem efeitos positivos. No entanto, os estudos existentes apresentam número amostral reduzido e os resultados são avaliados em curto prazo.

Ainda na área clínica, a utilização da técnica de injeção de Dióxido de Carbono, poderia trazer benefícios como um complemento terapêutico pela modulação da secreção de neuropeptídeos, no controle de doenças cutâneas de origem neuropeptidérgica, como psoríase, dermatites atópicas e o queiloide (AKAISHI *et al.*, 2008) além do tratamento clássico.

Uma das perguntas mais relevantes que este trabalho levanta é sobre a real influência da Substância P no resultado final da cicatriz. Estudos anteriores mostraram que a SP parece de fato contribuir para algum retardo nas fases iniciais da cicatrização, que precisariam ser melhor caracterizadas. No entanto, a influência da SP nas fases finais da cicatrização carece de mais estudos em animais e *in vitro*, para depois ser testada em humanos.

O CGRP mostra indícios de não participar de modo direto sobre as alterações cicatriciais, conforme descrito por outros autores (SMITH *et al.*, 2002; ZEGARSKA *et al.*, 2006; ROOSTERMAN *et al.*, 2006; LEFFLER *et al.*, 2008). São necessários maiores estudos para se definir as consequências das atividades imunomoduladoras e vasodilatadoras do CGRP, assim como sua real função na cicatrização.

**CONCLUSÃO**

## 7. CONCLUSÃO

As injeções de Dióxido de Carbono e Ar atmosférico em pele de ratos provocaram a diminuição local da quantidade de neuropeptídeos Substância P (SP) e pró-Peptídeo Relacionado com o Gene de Calcitonina (pró-CGRP) (15 kDa).

## **REFERÊNCIAS**



## 8. REFERÊNCIAS

Akaishi S, Ogawa R, Hyakusoku H. Keloid and hypertrophic scar: neurogenic inflammation hypotheses. *Med Hypotheses*. 2008;71(1):32-8.

Alves CJ, de Santana LP, dos Santos AJ, de Oliveira GP, Duobles T, Scorisa JM, Martins RS, Maximino JR, Chadi G. Early motor and electrophysiological changes in transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis and gender differences on clinical outcome. *Brain Res*. 2011;1394:90-104.

Bellamy JL, Cady RK, Durham PL. Salivary levels of CGRP and VIP in rhinosinusitis and migraine patients. *Headache*. 2006;46(1):24-33.

Besné I, Descombes C, Breton L. Effect of age and anatomical site on density of sensory innervation in human epidermis. *Arch Dermatol*. 2002;138(11):1445-50.

Bossini PS, Fangel R, Habenschus RM, Renno AC, Benze B, Zuanon JA, Neto CB, Parizotto NA. Low-level laser therapy (670 nm) on viability of random skin flap in rats. *Lasers Med Sci*. 2009;24(2):209-13.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248-54.

Brain SD, Cambridge H. Calcitonin gene-related peptide: vasoactive effects and potential therapeutic role. *Gen Pharmacol*. 1996;27(4):607-11.

Brain SD, Williams TJ. Interactions between the tachykinins and calcitonin gene-related peptide lead to the modulation of edema formation and blood flow in rat skin. *Br J Pharmacol*. 1989;97(1):77-82.

Brandi C, D'Aniello C, Grimaldi L, Bosi B, Dei I, Lattarulo P, Alessandrini C. Carbon dioxide therapy in the treatment of localized adiposities: clinical study and histopathological correlations. *Aesthetic Plast Surg*. 2001;25(3):170-4.

Brandi C, D'Aniello C, Grimaldi L, Caiazzo E, Stanghellini E. Carbon dioxide therapy: effects on skin irregularity and its use as a complement to liposuction. *Aesthetic Plast Surg*. 2004;28(4):222-5.

Brandi C, Grimaldi L, Nisi G, Brafa A, Campa A, Calabrò M, Campana M, D'Aniello C. The role of carbon dioxide therapy in the treatment of chronic wounds. *In Vivo*. 2010;24(2):223-6.

Brower MC, Johnson ME. Adverse effects of local anesthetic infiltration on wound healing. *Reg Anesth Pain Med*. 2003;28(3):233-40.

Calasans-Maia MD, Monteiro ML, Ascoli FO, Granjeiro JM. The rabbit as an animal model for experimental surgery. *Acta Cir Bras*. 2009;24(4):325-8.

Casale TB, Romero FA, Spierings EL. Intranasal noninhaled carbon dioxide for the symptomatic treatment of seasonal allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;121(1):105-9.

Caviedes-Bucheli J, Muñoz HR, Azuero-Holguín MM, Ulate E. Neuropeptides in dental pulp: the silent protagonists. *J Endod*. 2008;34(7):773-88.

Caviedes-Bucheli J, Rojas P, Escalona M, Estrada A, Sandoval C, Rivero C, Lombana N, Muñoz HR. The effect of different vasoconstrictors and local anesthetic solutions on substance P expression in human dental pulp. *J Endod.* 2009;35(5):631-3

Chadi G, Silva C, Maximino JR, Fuxe K, da Silva GO. Adrenalectomy counteracts the local modulation of astroglial fibroblast growth factor system without interfering with the pattern of 6-OHDA-induced dopamine degeneration in regions of the ventral midbrain. *Brain Res.* 2008;1190:23-38.

Cooper AJ, Johnson CD. Animal experimentation. *Br J Surg.* 1991;78(12):1409-11.

Costa MS, Pinfildi CE, Gomes HC, Liebano RE, Arias VE, Silveira TS, Ferreira LM. Effect of low-level laser therapy with output power of 30mW and 60mW in the viability of a random skin flap. *Photomed Laser Surg.* 2010;28(1):57-61.

Cury V, Bossini PS, Fangel R, Crusca Jde S, Renno AC, Parizotto NA. The effects of 660nm and 780nm laser irradiation on viability of random skin flap in rats. *Photomed Laser Surg.* 2009;27(5):721-4.

Delgado AV, McManus AT, Chambers JP. Exogenous administration of Substance P enhances wound healing in a novel skin-injury model. *Exp Biol Med (Maywood).* 2005;230(4):271-80.

Drucker M, Cardenas E, Arizti P, Valenzuela A, Gamboa A. Experimental studies on the effect of lidocaine on wound healing. *World J Surg.* 1998;22(4):394-7.

Esteves Júnior I, Tacani PM, Liggieri VC, Ruggi BG, Ferreira LM, Liebano RE. Histamine iontophoresis on the viability of random skin flap in rats. *Acta Cir Bras.* 2009;24(1):48-51.

Fagundes DJ, Taha MO. Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente. *Acta Cir Bras.* 2004;19(1):59-65.

Ferreira JC, Haddad A, Tavares SA. Increase in collagen turnover induced by intradermal injection of carbon dioxide in rats. *J Drugs Dermatol.* 2008;7:201-206.

Ferreira LM, Hochman B, Barbosa MV. [Experimental models in research]. *Acta Cir Bras.* 2005;20 Suppl 2:28-34.

Ferreira LM, Gragnani A, Furtado F, Hochman B. Control of the skin scarring response. *Anais da Academia Brasileira de Ciências.* 2009;81(3):623-629.

Ferreira LM, Sobral SC, Blanes L, Ipolito MZ, Koribe EK. Proliferation of fibroblasts cultured on a hemi-cellulose dressing. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery.* 2010;63, 865 e 869.

Fujii Y, Sengoku T, Takakura S. Repeated topical application of glucocorticoids augments irritant chemical-triggered scratching in mice. *Arch Dermatol Res.* 2010;302(9):645-52.

Gennari C, Nami R, Pecchi S, De Franco V, Panza F, Pavese G. Plethysmographic evaluation of the vascular effects of human calcitonin gene-related peptide in man. *Angiology.* 1991;42(6):462-7.

Hara M, Toyoda M, Yaar M. Innervation of melanocytes in human skin. *J Exp Med.* 1996;184:1385-95.

Hartmann BR, Bassenge E, Pittler M. Effect of carbon dioxide-enriched water and fresh water on the cutaneous microcirculation and oxygen tension in the skin of the foot. *Angiology*. 1997;48(4):337-43.

Henderson J, Terenghi G, Ferguson MW. The reinnervation and revascularisation pattern of scarless murine fetal wounds. *J Anat*. 2011;218(6):660-7.

Hochman B, Nahas FX, Sobral CS, Arias V, Locali RF, Juliano Y, Ferreira LM. Nerve fibres: a possible role in keloid pathogenesis. *Br J Dermatol*. 2008;158(3):651-2.

Hochman B, Furtado F, Isoldi FC, Nishioka MA, Ferreira LM. Psychological Stress and Skin Wound Healing: New Highlights. In: *Psychology of stress: New Research*. Nova Science Publishers, New York, USA.2013.

Hua XY, Yaksh TL. Pharmacology of the effects of bradykinin, serotonin, and histamine on the release of calcitonin gene-related peptide from C-fiber terminals in the rat trachea. *J Neurosci*. 1993;13(5):1947-53.

Kalil-Gaspar P. Neuropeptídeos na pele / Neuropeptides in the skin. *An Bras Dermatol*. 2003;78(4):483-98.

Kami T, Yoshimura Y, Nakajima T, Ohshiro T, Fujino T. Effects of low-power diode lasers on flap survival. *Ann Plast Surg*. 1985;14(3):278-83.

Kubota J, Oshiro T. The effects of diode laser LLLT on flap survival: measurement of flap microcirculation with laser speckle flowmetry. *Laser Ther*. 1996;8 241-6.

Kubota J. Effects of diode laser therapy on blood flow in axial pattern flaps in the rat model. *Lasers Med Sci.* 2002;17(3):146-53.

Kusakabe T, Hirakawa H, Matsuda H, Yamamoto Y, Nagai T, Kawakami T, Takenaka T, Hayashida Y. Changes in the peptidergic innervation in the carotid body of rats chronically exposed to hypercapnic hypoxia: an effect of arterial CO<sub>2</sub> tension. *Histol Histopathol.* 2002;17(1):21-9.

LaVinka PC, Park TJ. Blunted behavioral and c Fos responses to acidic fumes in the African naked mole-rat. *PLoS One.* 2012;7(9):e45060.

Leffler A, Fischer MJ, Rehner D, Kienel S, Kistner K, Sauer SK, Gavva NR, Reeh PW, Nau C. The vanilloid receptor TRPV1 is activated and sensitized by local anesthetics in rodent sensory neurons. *J Clin Invest.* 2008;118(2):763-76.

Liang Z, Engrav LH, Muangman P, Muffley LA, Zhu KQ, Carrougher GJ, et al. Nerve quantification in female red Duroc pig (FRDP) scar compared to human hypertrophic scar. *Burns.* 2004;30(1):57-64.

Liebano RE, Ferreira LM, Sabino Neto M. Transcutaneous electrical nerve stimulation on viability of random skin flap in rats. *Can J Plast Surg.* 2002;10:151-4.

Mandarim-de-Lacerda CA. Stereological tools in biomedical research. *An Acad Bras Cienc.* 2003;75(4):469-86.

Martinsson T, Haegerstrand A, Dalsgaard CJ. Ropivacaine and lidocaine inhibit proliferation of non-transformed cultured adult human fibroblasts, endothelial cells and keratinocytes. *Agents Actions.* 1993;40(1-2):78-85.

Misery L. Atopic dermatitis and the nervous system. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2011;41(3):259-66.

Mishima T, Ito Y, Hosono K, Tamura Y, Uchida Y, Hirata M, Suzsuki T, Amano H, Kato S, Kurihara Y, Kurihara H, Hayashi I, Watanabe M, Majima M. Calcitonin gene-related peptide facilitates revascularization during hindlimb ischemia in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011;300(2):H431-9.

Monteiro R, Brandau R, Gomes WJ, Braile DM. Trends in animal experimentation. *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 2009;24(4):506-13.

Nach R, Zandifar H, Gupta R, Hamilton JS. Subcutaneous carboxytherapy injection for aesthetic improvement of scars. *Ear Nose Throat J.* 2010;89(2):64-6.

Onuoha GN, Nugent AM, Hunter SJ, Alpar EK, McEneaney DJ, Campbell NP, Shaw C, Buchanan KD, Nicholls DP. Neuropeptide variability in man. *Eur J Clin Invest.* 2000;30(7):570-7.

Pavlovic S, Liezmann C, Blois SM, Joachim R, Kruse J, Romani N, Klapp BF, Peters EM. Substance P is a key mediator of stress-induced protection from allergic sensitization via modified antigen presentation. *J Immunol.* 2011;186(2):848-55.

Peters EM, Ericson ME, Hosoi J, Seiffert K, Hordinsky MK, Ansel JC, Paus R, Scholzen TE. Neuropeptide control mechanisms in cutaneous biology: physiological and clinical significance. *J Invest Dermatol.* 2006;126(9):1937-47.

- Pinfildi CE, Liebano RE, Hochman BS, Ferreira LM. Helium-neon laser in viability of random skin flap in rats. *Lasers Surg Med.* 2005;37(1):74-7.
- Prado R, Neves L, Marcolino A, Ribeiro T, Pinfildi C, Ferreira L, Thomazini J, Piccinato C. Effect of low-level laser therapy on malondialdehyde concentration in random cutaneous flap viability. *Photomed Laser Surg.* 2010;28(3):379-84.
- Prado RP, Pinfildi CE, Liebano RE, Hochman BS, Ferreira LM. Effect of application site of low-level laser therapy in random cutaneous flap viability in rats. *Photomed Laser Surg.* 2009;27(3):411-6.
- Rook JM, McCarson KE. Delay of cutaneous wound closure by morphine via local blockade of peripheral tachykinin release. *Biochem Pharmacol.* 2007;74(5):752-7.
- Roosterman D, Goerge T, Schneider SW, Bunnett NW, Steinhoff M. Neuronal control of skin function: the skin as a neuroimmunoendocrine organ. *Physiol Rev.* 2006;86(4):1309-79.
- Savin E, Bailliart O, Bonnin P, Bedu M, Cheynel J, Coudert J, Martineaud JP. Vasomotor effects of transcutaneous CO<sub>2</sub> in stage II peripheral occlusive arterial disease. *Angiology.* 1995;46(9):785-91.
- Schanaider A, Silva PC. Uso de animais em cirurgia experimental. *Acta Cir Bras.* 2004;19(4):441-7.
- Schmelz M, Petersen LJ. Neurogenic inflammation in human and rodent skin. *News Physiol Sci.* 2001;16:33-7.
- Schnaider TB, Souza Cd. [Ethics and animal experiments.]. *Rev Bras Anesthesiol.* 2003;53(2):278-85.



Scorza FA, Borges FS. Carboxiterapia: Uma revisão. *Rev Fisioterapia Ser.* 2008; 3(4):1-11.

Smith PG, Liu M. Impaired cutaneous wound healing after sensory denervation in developing rats: effects on cell proliferation and apoptosis. *Cell Tissue Res.* 2002;307(3):281-91.

Steinhoff M, Ständer S, Seeliger S, Ansel JC, Schemelz M, Luger T. Modern aspects of cutaneous neurogênica inflammation. *Arch Dermatol.* 2003;139:1479-88.

Toriyama T, Kumada Y, Matsubara T, Murata A, Ogino A, Hayashi H, Nakashima H, Takahashi H, Matsuo H, Kawahara H. Effect of artificial carbon dioxide foot bathing on critical limb ischemia (Fontaine IV) in peripheral arterial disease patients. *Int Angiol.* 2002;21(4):367-73.

Varlaro V, Manzo G, Mugnaini F, Bisacci C, Fiorucci P, Rango P, Bisacci R. Carboxytherapy: effects on microcirculation and its use in the treatment of severe lymphedema A review. *Acta Phlebol.* 2007;8:0-0.

Vause C, Bowen E, Spierings E, Durham P. Effect of carbon dioxide on calcitonin gene-related peptide secretion from trigeminal neurons. *Headache.* 2007;47(10):1385-97.

Vyklický L, Knotková-Urbancová H, Vitásková Z, Vlachová V, Kress M, Reeh PW. Inflammatory mediators at acidic pH activate capsaicin receptors in cultured sensory neurons from newborn rats. *J Neurophysiol.* 1998;79(2):670-6.

Wallengren J, Chen D, Sundler F. Neuropeptide-containing c-fibres and wound healing in rat skin. Neither capsaicin nor peripheral neurotomy affect the rate of healing. *Br J Dermatol.* 1999;140(3):400-8.

Weidner C, Klede M, Rukwied R, Lischetzki G, Neisius U, Skov PS, Petersen LJ, Schmelz M. Acute effects of substance P and calcitonin gene-related peptide in human skin--a microdialysis study. *J Invest Dermatol.* 2000;115(6):1015-20.

Wimalawansa SJ. Calcitonin gene-related peptide and its receptors: molecular genetics, physiology, pathophysiology, and therapeutic potentials. *Endocr Rev.* 1996;17(5):533-85.

Yamada M, Ishikawa T, Yamanaka A, Fujimori A, Goto K. Local neurogenic regulation of rat hindlimb circulation: CO<sub>2</sub>-induced release of calcitonin gene-related peptide from sensory nerves. *Br J Pharmacol.* 1997;122(4):710-4.

Zegarska B, Lelińska A, Tyrakowski T. Clinical and experimental aspects of cutaneous neurogenic inflammation. *Pharmacol Rep.* 2006;58(1):13-21.

**NORMAS ADOTADAS**

## NORMAS ADOTADAS

- A.C.L.A.M – *American College of Laboratory Animal Medicine* - Princípios éticos da experimentação animal. Disponível em: <http://www.aclam.org>.
  
- C.O.B.E.A. (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal) - Princípios éticos da experimentação animal (no caso do uso dos mesmos). Disponível no endereço eletrônico: <http://www.meusite.com.br/cobea/index.htm>
  
- Descritores em Ciências da Saúde [Internet]. São Paulo: Centro Latino-Americano e do Caribe de Informações em Ciências da Saúde; [Acesso em 2012 Jul 2 ]. Disponível no endereço eletrônico: <http://decs.bvs.br/>
  
- Federative Committee on Anatomical Terminology. Terminologia anatômica Internacional. Tradução da Comissão de Terminologia Anatômica da Sociedade Brasileira de Anatomia. São Paulo: Manole; 2001.
  
- Ferreira LM, Goldenberg S, Nahas FX, Barbosa MVJ, Ely PB, Blanes L, Bretos JLG. Orientação Normativa para Elaboração e Apresentação de Teses. Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Plástica Reparadora UNIFESP-EPM. 1.ed. São Paulo:Livraria Médica Paulista Editora, 2008.

- ICMJE – International Committee of Medical Journals Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journal. Disponível no endereço eletrônico: <http://www.icmje.org>.
- International Committee on Veterinary Gross Anatomical Nomenclature Nomina Anatômica Veterinária. 3.ed. New York:Ithaca, 1983. 216p.
- Terminologia Anatômica. Terminologia Anatômica Internacional. São Paulo: Manole; 2001. 248p.

**ABSTRACT**

## ABSTRACT

**Introduction:** The Carbon Dioxide (CO<sub>2</sub>) infusion is a non surgical technique where the carbon gas is inject in the subcutaneous tissue. On the literature there are studies that suggest that the gas promotes stimulus of the physiological effects, such as circulation improvement, tissue oxygenation, collagen and new elastic fibers formation. Effects that possibly occur after the needle perforation, generating an inflammatory response, aiming to destroy, dilute or block the aggressor agent once the Neurogenic Inflammation (NI) is one of the first cicatrization events that happen. In response to a skin noniceptive stimulus, there is the release of pro-inflammatory cutaneous neuropeptides (NP's), substances that are produced by the brain cells from dorsal root ganglia and secreted by the skin nervous terminations, and are launched on the inflammatory phase of the cicatrization. **Objective:** to investigate the Carbon Dioxide (CO<sub>2</sub>) injection on the neuropeptides secretion of the Peptide related to the Calcitonine (CGRP) and the P Substance (CSP) in rats skin. **Method:** there were used 56 Wistar-EPM rats divided into two groups, one for CGRP analysis and the other for SP. Each group was subdivided in 4 sub groups: control, needle control CO<sub>2</sub> injection and air injection, each group with 7 rats. The partial skin sample analysis was done by *Western Blotting* (WB). **Results:** regarding the presence of the neuropeptides on the rats skin, on the SP group there was a decrease on the amount of the neuropeptides on the subgroup 3 and on the subgroup 4, Air injection; on the CGRP subgroup, there was a decrease on the amount of neuropeptides pro-CGRP, CO<sub>2</sub> injection and also on the subgroup 4, Air injection; on the CGRP group, there was a decrease on the amount of neuropeptides there was pro-CGRP (15kDa) on the subgroup 4, injection of CO<sub>2</sub>. On the subgroup 4 there wasn't any decrease on the amount of the effective GCRP (5 kDa). **Conclusion:** The CO<sub>2</sub> and the Air injection in rats skin produces a decrease on the amount of SP neuropeptides and pro-CGRP (15 kDa).

## **APÊNDICES**



# APÊNDICES

## Apêndice 1: APROVAÇÃO PELO CEP



Universidade Federal de São Paulo  
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa  
Hospital São Paulo

São Paulo, 12 de Novembro de 2010.  
CEP 1695/10

Ilmo(a). Sr(a).  
Pesquisador(a) ERICA CALCAGNO RAYMUNDO DA SILVA  
Co-investigadores: Lydía Massako Ferreira; Bernardo Hochman  
Disciplina/Departamento: Cirurgia Plástica/Cirurgia da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo  
Patrocinador: Recursos Próprios.

### PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: "Dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) subcutâneo na secreção de neuropeptídeos CGRP e SP em pele de ratos".

**CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO:** Estudo experimental agudo em ratos Wistar, machos (n=36).

**RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE:** Não se aplica.

**OBJETIVOS:** Investigar a injeção do dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) na secreção dos neuropeptídeos pró-inflamatórios calcitonin gene-related peptide (CGRP), substância P (SP) na pele de ratos..

**RESUMO:** Serão utilizados 36 ratos Wistar, machos, adultos, oriundos do CEDEME da Unifesp. Os animais serão distribuídos em 3 grupos: injeção de CO<sub>2</sub>; injeção com CO<sub>2</sub> e incisão cirúrgica; incisão cirúrgica, com n=12 em cada grupo. Os animais serão submetidos à anestesia geral por via i.p., utilizando cloridrato de zolazepam e cloridrato de tiletamina, e após posicionados, será realizada uma epilação por arrancamento bidigital para administração do gás terapêutico dióxido de carbono, em um ponto único de 1,5cm de reta A, durante 30 segundos com 20mmHg de pressão do gás. Após o término da infiltração de CO<sub>2</sub> será realizado a incisão por meio de um bisturim com lâmina 15 em sentido crânio-caudal. A incisão interessará a pele e o Panniculus carnosus até a fáscia muscular, e logo em seguida a sutura com dois pontos fixos a cada 1,5cm, retirando-se toda essa área de pele por dissecação e enviando uma amostra para análise histológica. Os animais serão eutanasiados por hiperdosagem anestésica de ketamina e xilazina. Os dados obtidos de todos os grupos estudados serão analisados e comparados estatisticamente..

**FUNDAMENTOS E RACIONAL:** Atualmente, os estudos de pele de ratos estão bem caracterizados em termo de nocicepção de resposta à estímulos externos, para determinar a correlação com a liberação dos neuropeptídeos, entretanto o presente estudo, poderá ser de extrema ajuda para futuras aplicações clínicas no uso da injeção de dióxido de carbono no processo de cicatrização cutânea em humanos.

**MATERIAL E MÉTODO:** Descritos os procedimentos experimentais.

**DETALHAMENTO FINANCEIRO:** Sem financiamento específico.

**CRONOGRAMA:** 12 Meses.

**OBJETIVO ACADÊMICO:** Não envolve obtenção de título.



Universidade Federal de São Paulo  
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa  
Hospital São Paulo

**ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA: 7/11/2011 e 8/11/2012.**

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo ANALISOU e APROVOU o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da  
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

169310

**Apêndice 2:** Dados utilizados para análise estatística dos resultados de neuropeptídeos Substância P (SP), Pró-Peptídeo Relacionado com o Gene de Calcitonina (Pró-CGRP) 15 kDa e CGRP 5 kDa.

<b>CGRP 15 kDa SP</b>			
Cont_15kDa	Cont Ag_15kDa	Inj O <sub>2</sub> _15kDa	Inj CO <sub>2</sub> _15kDa
78,59	71,70	71,60	57,34
79,81	62,29	44,80	62,75
68,74	83,93	61,09	58,02
70,10	74,85	56,02	53,14
67,32	59,36	59,11	<b>38,36</b>
76,67	65,66	42,99	54,01
56,44	59,39	60,70	63,33
<b>CGRP 05 kDa</b>			
Cont_5kDa	Cont Ag_5kDa	Inj O <sub>2</sub> _5kDa	Inj CO <sub>2</sub> _5kDa
59,30	51,38	55,08	50,03
48,41	58,79	45,05	56,63
67,73	76,23	76,33	75,94
68,14	53,41	47,26	63,46
67,84	68,31	63,87	61,89
49,43	48,19	45,94	65,55
61,06	66,27	64,12	71,44
<b>SP</b>			
Cont	Cont Ag	Inj O <sub>2</sub>	Inj CO <sub>2</sub>
50,07	44,46	21,82	29,95
33,39	14,31	15,78	11,74
29,36	28,33	21,35	19,09
28,12	57,42	18,68	24,93
55,91	43,29	27,68	22,76
22,01	35,51	10,33	8,72
31,48	17,08	9,63	9,22

**Apêndice 3:** Análise descritiva dos dados dos neuropeptídeos SP, Pró CGRP 15 kDa e CGRP 5 kDa.

ESTATISTICAS DESCRITIVAS – CGRP 15 kDa				
Estadística	Cont	Cont Ag	Inj O <sub>2</sub>	Inj CO <sub>2</sub>
Média	71,10	68,17	56,62	55,28
Mediana	70,10	65,66	59,11	57,34
Limite Superior	79,81	83,93	71,60	63,33
Limite Inferior	56,44	59,36	42,99	38,36
ESTATISTICAS DESCRITIVAS – CGRP 05 kDa				
Estadística	Cont	Cont Ag	Inj O <sub>2</sub>	Inj CO <sub>2</sub>
Média	60,27	60,37	56,81	63,56
Mediana	61,06	58,79	55,08	63,46
Limite Superior	68,14	76,23	76,33	75,94
Limite Inferior	48,41	48,19	45,05	50,03
ESTATISTICAS DESCRITIVAS - SP				
Estadística	Cont	Cont Ag	Inj O <sub>2</sub>	Inj CO <sub>2</sub>
Média	35,76	34,34	17,90	18,06
Mediana	31,48	35,51	18,68	19,09
Limite Superior	55,91	57,42	27,68	29,95
Limite Inferior	22,01	14,31	9,63	8,72

**Apêndice 4:** Teste Mann Whitney para grupo de Neuropeptídeos Pró-CGRP 15 kDa com *outlier*.

COMPARAÇÕES – CGRP 15 kDa -Com <i>Outlier</i>		
GRUPOS	P-VALOR	CONCLUSÃO
Cont x Cont Ag	0,482	$p \leq 0,05$ , há diferença entre os grupos
Cont x Inj O <sub>2</sub>	0,025	$p \leq 0,05$ , há diferença entre os grupos
Cont x Inj CO <sub>2</sub>	0,009	$p \leq 0,05$ , há diferença entre os grupos
Cont Ag X Inj O <sub>2</sub>	0,035	$p \leq 0,05$ , há diferença entre os grupos
Cont Ag x Inj CO <sub>2</sub>	0,018	$p \leq 0,05$ , há diferença entre os grupos
Inj O <sub>2</sub> x Inj CO <sub>2</sub>	0,749	$p \geq 0,05$ , não há diferença entre os grupos

**Apêndice 5:** Teste Mann Whitney para grupo de Neuropeptídeos Pró-CGRP 15 kDa sem *outlier*

COMPARAÇÕES – CGRP 15kDa - Sem <i>Outlier</i>		
GRUPOS	P-VALOR	CONCLUSÃO
Cont x Inj CO <sub>2</sub>	0,015	$p \leq 0,05$ , há diferença entre os grupos
Cont Ag x Inj CO <sub>2</sub>	0,032	$p \leq 0,05$ , há diferença entre os grupos
Inj O <sub>2</sub> x Inj CO <sub>2</sub>	0,886	$p \geq 0,05$ , não há diferença entre os grupos

**Apêndice 6:** Teste Mann Whitney para grupo de Neuropeptídeos CGRP 5 kDa.

COMPARAÇÕES – CGRP 05 kDa		
GRUPOS	P-VALOR	CONCLUSÃO
Cont x Cont Ag	0,949	$p \geq 0,05$ , não há diferença entre os grupos
Cont x Inj O <sub>2</sub>	0,338	$p \geq 0,05$ , não há diferença entre os grupos
Cont x Inj CO <sub>2</sub>	0,482	$p \geq 0,05$ , não há diferença entre os grupos
Cont Ag X Inj O <sub>2</sub>	0,406	$p \geq 0,05$ , não há diferença entre os grupos
Cont Ag x Inj CO <sub>2</sub>	0,655	$p \geq 0,05$ , não há diferença entre os grupos
Inj O <sub>2</sub> x Inj CO <sub>2</sub>	0,277	$p \geq 0,05$ , não há diferença entre os grupos

**Apêndice 7:** Teste Mann Whitney para grupo de Neuropeptídeos SP.

COMPARAÇÕES SP		
GRUPOS	P-VALOR	CONCLUSÃO
Cont x Cont Ag	0,949	$p \geq 0,05$ , não há diferença entre os grupos
Cont x Inj O <sub>2</sub>	0,003	$p \leq 0,05$ , há diferença entre os grupos
Cont x Inj CO <sub>2</sub>	0,013	$p \leq 0,05$ , há diferença entre os grupos
Cont Ag X Inj O <sub>2</sub>	0,048	$p \leq 0,05$ , há diferença entre os grupos
Cont Ag x Inj CO <sub>2</sub>	0,048	$p \leq 0,05$ , há diferença entre os grupos
Inj O <sub>2</sub> x Inj CO <sub>2</sub>	0,949	$p \geq 0,05$ , não há diferença entre os grupos



**ANEXOS**

## ANEXOS

### Anexo 1: Máquina de cortar cabelo – Marca WAHL®

The screenshot shows the WAHL Professional website interface. At the top, there is a navigation bar with 'PRODUTOS' and links for 'Página Inicial', 'Sobre a Wahl', 'Wahl no mundo', 'Contato', 'Login', and 'Registre-Se'. The main header features the WAHL logo and the text 'A MARCA Nº 1 DO MUNDO'. Below this, a breadcrumb trail reads 'Você está aqui: Wahl Brasil > Linha Profissional > Máquinas de Cortar Cabelo > Super Taper'. The left sidebar contains a 'LINHA PROFISSIONAL' menu with options like 'Lâminas de Corte', 'Máquinas de Aparar Cabelo', 'Máquinas de Cortar Cabelo', and 'Secadores de Cabelo'. A 'Wahl Clipper' section below the menu features a photo of a woman and the text 'Desde 1919, a marca preferida pelos profissionais do mundo inteiro!'. The main content area displays a large image of the Super Taper clipper. To the right of the image, the text 'Super Taper' is displayed. Below the image, there are two columns of bullet points describing the product's features. At the bottom, an 'ESPECIFICAÇÕES' section lists cutting lengths and voltage options. The footer contains a 'Select country/region' list with various international locations.

**PRODUTOS**    Página Inicial    Sobre a Wahl    Wahl no mundo    Contato    Login    Registre-Se

**WAHL®**  
PROFISSIONAL

A MARCA Nº 1 DO MUNDO

Você está aqui: Wahl Brasil > Linha Profissional > Máquinas de Cortar Cabelo > Super Taper

**LINHA PROFISSIONAL**

- Lâminas de Corte
- Máquinas de Aparar Cabelo
- Máquinas de Cortar Cabelo
- Secadores de Cabelo

**Wahl Clipper**  
Desde 1919, a marca preferida pelos profissionais do mundo inteiro!

**Super Taper**

- > Cortador poderoso com motor vibratório.
- > Ideal para grandes exigências e uso contínuo.
- > Lâmina profissional à prova de ferrugem
- > Motor Shunt de maior potência.
- > Regulador de nível de corte.
- > A máquina mais vendida da Wahl a nível mundial.
- > 2 anos de garantia.

**ESPECIFICAÇÕES**

- Cutting Length: Pentas: nº1-3mm, nº2-6mm, nº3-10mm, nº4-13mm, nº6-19mm, nº8-25mm.
- Mains voltage: Disponível em 2 voltagens, 110 e 220.

> Sobre a Wahl  
> Wahl no mundo

Select country/region: | Wahl Argentina | Wahl Austria | Wahl Brasil | Wahl Canada | Wahl Canada (French) | Wahl China | Wahl España | Wahl Europe | Wahl Germany | Wahl Hungary | Wahl India | Wahl Japan | Wahl Mexico | Wahl Middle East | Wahl North Africa | Wahl Russia | Wahl South Africa | Wahl The Netherlands | Wahl United Kingdom | Wahl USA

Disponível em URL: <http://www.wahlglobal.com/brazil/wahl/linha-profissional/maquinas-de-cortar-cabelo/super-taper.html>

## Anexo 2: Dermátomo Elétrico – Marca Integra/Padgett®

The screenshot shows the Integra website interface. At the top left is the Integra logo with the tagline 'LIMIT UNCERTAINTY'. To the right is a language selector set to 'English US' and a search bar. Below the logo is a navigation menu with buttons for 'Home', 'About Integra', 'Products', 'Investors', 'Careers', and 'Contact'. A breadcrumb trail reads 'Home > Surgical Instruments > Jarit'.

The main content area features a large banner image of a honeycomb pattern with the text 'Integra™ Jarit® Instruments'. Below this is a 'Product Information' section with tabs for 'Product Information', 'Downloads', and 'Request More Info.'. The 'Product Information' tab is active, displaying the following content:

**Model PI Electric Dermatome**

The Model PI Electric Dermatome was developed in response to requests by leading tissue banks. We gave it all of the superior quality, precision, dependability and value a surgeon has come to expect from Padgett Instruments. Now, you can harvest a skin graft up to six inches wide using Padgett's electric Dermatome Model PI. A six-inch wide graft can cover most adult hands or a small child's face without seams. Facts and Features:

- Only six-inch powered dermatome available
- Tested in tissue banks
- Fewer seams
- Two, three, four, five and six inch wide grafts
- Can cover most hands or a small child's face
- Constant on/off switch option

Order Numbers: 3539-600: PADGETT Model PI Dermatome, complete, 120 Volt  
 3539-600-230: PADGETT model PI Dermatome, complete, 230 Volts  
 3539-602: Sterile 6-inch Dermatome Blades, Box of 10

If you prefer to receive this Instruction For Use in paper form, please contact our Technical Services Department by phone at 800-654-2873 or by e-mail at [ReconUSProductSupportNJ@integralife.com](mailto:ReconUSProductSupportNJ@integralife.com).

Accompanying the text are images of the Model PI Electric Dermatome and its components, including blades and a power cord.

On the left side of the page is a green sidebar menu with the following sections:


- Catalogs**
  - Search by Surgical Specialty
  - Search by Description
  - Enter a Catalog Number
  - Suggested Sets
  - Jarit® Online Catalog
  - Ruggles™ - Redmond™ Online Catalog
- Cross Reference**
  - Find Any Instrument
- Build a Tray**
  - Suggested Sets
  - Search Our Catalog
  - Preview and Print Tray
- Instructions For Use**
- Service and Repair**
- Product Information**
  - Jarit®
  - Padgett® Plastic Surgery Instruments
  - Ruggles™ - Redmond™
  - Neuro/Spine Instruments
- Contact Us / Locate a Representative**

Disponível em URL: [http://www.integralife.com/Jarit/Jarit-Product-Detail.aspx?Product=121&ProductName=Model %20PI %20Electric %20Dermatome&ProductLineName=PADGETT %C2 %AE&ProductLineID=158](http://www.integralife.com/Jarit/Jarit-Product-Detail.aspx?Product=121&ProductName=Model%20PI%20Electric%20Dermatome&ProductLineName=PADGETT%20C2%20AE&ProductLineID=158)

**Anexo 3:** *Punch* cutâneo de 4 mm de diâmetro – Marca Richter®



## Anexo 4: Ficha de informações de segurança de produtos químicos conforme NBR 14725

	<b>FISPQ</b> <b>Dióxido de Carbono</b>	FISPQ 07
		Revisão: 02/10/2012
		Página 1 de 8

Ficha de informações de segurança de produtos químicos, conforme NBR 14725.

### 1 IDENTIFICAÇÃO DO PRODUTO

Nome do produto:	<b>Dióxido de Carbono Industrial – CO2</b> <b>Dióxido de Carbono Super Seco – CO2 SS</b> <b>Dióxido de Carbono Medicinal</b> <b>Dióxido de Carbono Refrigerado</b>
Empresa fornecedora:	Gama Gases Especiais Ltda. Estrada Particular Sadae Takagi, 350 – Bairro: Cooperativa. São Bernardo do Campo – SP - CEP 09852-070 Tel.: 55 (11) 4343 4000 Fax.: 55 (11) 4343 4777 Tel. Emergência: 0800-7071 767 e-mail: laboratorio@gamagases.com.br

### 2 IDENTIFICAÇÕES DE PERIGOS

#### PERIGOS MAIS IMPORTANTES:

O CO<sub>2</sub> é uma substância incolor, não inflamável que se apresenta na forma líquida ou gasosa. Pode levar a rápida sufocação quando sua concentração é suficiente para reduzir a concentração de oxigênio abaixo de 19,5%. No estado líquido, devido à sua baixa temperatura, pode causar queimaduras extremamente dolorosas. Vazamentos de líquido ou vapor refrigerado formam uma névoa branca que dificultam ou até impossibilitam a visão no local de um vazamento além de poder haver formação de gelo tornando o local extremamente escorregadio. Por ser um produto de odor familiar, uma contaminação de grandes proporções em um ambiente confinado não será facilmente percebida, por isso, é necessário monitorar a concentração de O<sub>2</sub> quando se suspeite que a presença de CO<sub>2</sub> possa ser elevada.


#### EFEITOS ADVERSOS A SAUDE HUMANA:

O Dióxido de carbono, geralmente é considerado um asfixiante simples, porém, este produto possui alguns efeitos nocivos. A inalação de concentrações elevadas deste gás no ar atmosférico pode causar asfixia e morte.  
 No estado líquido, em contato com a pele causa queimaduras por frio, que são muito doloridas.  
 O contato do líquido com os olhos é extremamente perigoso, pois, pode levar à perda da visão.

#### EFEITOS AMBIENTAIS:

Não tóxico, dilui no ar atmosférico. Contribui para o efeito estufa. Os vapores dos gases liquefeitos são mais pesados do que o ar, tendendo a ficar próximo ao solo e se infiltrar em esgotos e galerias subterrâneas. Solubilidade em água: altamente solúvel.

#### PERIGOS FISICO E QUIMICO:

	<b>FISPQ</b> <b>Dióxido de Carbono</b>	FISPQ 07
		Revisão: 02/10/2012
		Página 2 de 8

Em contato com água produz ácido carbônico, que é corrosivo.  
O cilindro pode se romper ou explodir se exposto a calor excessivo.

**SINTOMAS:**

Os sintomas que indicam que um processo de asfixia se iniciou podem ser: dor de cabeça, tontura, aceleração da respiração e batimento cardíaco, fraqueza muscular e zumbido nos ouvidos.

---

**3 COMPOSIÇÃO QUÍMICA**

O Dióxido de Carbono é uma substância pura, que à temperatura ambiente e pressão atmosférica se apresenta como um gás não inflamável, incolor e com odor e sabor levemente ácido (idêntico ao da água mineral gaseificada). Uma vez e meia mais denso que o ar atmosférico, é altamente solúvel em água.

Sinônimos: Gás Carbônico

Componente	Fórmula	CAS
Dióxido de Carbono	CO <sub>2</sub>	124-38-9

Incompatibilidade: Nenhuma - Uma aplicação muito importante deste produto é ser agente extintor de incêndio.

---

**4 PRIMEIROS SOCORROS**

**PRECAUÇÕES:**

Antes de entrar em área que exista a suspeita de contaminação com altas concentrações de dióxido de carbono a pessoa ou equipe de resgate deve estar utilizando uma unidade de respiração autônoma.

**INALAÇÃO:**


Remova a vítima imediatamente para um lugar descontaminado de preferência ao ar livre. Caso a pessoa esteja apresentando **dificuldade respiratória**, pode ser administrado oxigênio puro por alguns minutos.

Caso a pessoa apresente **parada respiratória** será necessário fazer respiração artificial (boca a boca) seguida de administração de oxigênio.

Caso haja **parada cardíaca**, administrar massagem cardíaca simultaneamente à respiração artificial, fazendo-se 5 massagens cardíacas e uma respiração alternadamente. Em **qualquer caso** chame imediatamente um médico ou socorro especializado.

**CONTATO COM A PELE:**

O gás em contato com a pele ou olhos normalmente não causa maiores problemas. No estado líquido o contato com a pele causa queimadura por frio, que é muito dolorida (as dores são equivalentes às ocasionadas por óleo fervente). Lave o local com água corrente,

	<b>FISPQ</b> <b>Dióxido de Carbono</b>	FISPQ 07
		Revisão: 02/10/2012
		Página 3 de 8

**NÃO USE ÁGUA QUENTE**, caso a vítima esteja consciente, incentive-a a movimentar as partes atingidas enquanto são descongeladas.  
Chame imediatamente um médico ou socorro especializado.

**CONTATO COM OS OLHOS:**

Em caso de contato dos olhos com dióxido de carbono líquido, os mesmos devem ser lavados com água em abundância por pelo menos 15 minutos, caso a pessoa utilize lentes de contato, após o descongelamento do local, as mesmas devem ser removidas para garantir que a água consiga lavar o local atingido. Caso seja notado que a irritação dos olhos persiste os mesmos devem ser lavados por um segundo período de 15 minutos e a pessoa encaminhada a um oftalmologista imediatamente.

**5 MEDIDAS DE COMBATE A INCENDIO**

**PRODUTO NÃO INFLAMÁVEL**, usar equipamento apropriado para o material que realmente esteja pegando fogo.


Os cilindros contêm gás sob pressão, sendo necessário mantê-los longe das chamas e/ou sob resfriamento por neblina de água, pois, caso os cilindros sejam aquecidos sua pressão e temperatura se elevarão sobrecarregando a estrutura do cilindro ao mesmo tempo em que o calor provocará seu amolecimento podendo levar à explosão por falha estrutural. O próprio dióxido de carbono pode ser utilizado como agente de combate ao fogo principalmente em circuitos elétricos. É necessário cuidado em ambientes confinados para evitar asfixia. Em caso de incêndio envolvendo reservatórios criogênicos contendo dióxido de carbono líquido refrigerado, é importante mantê-los, resfriados por neblina de água.

**INSTRUÇÕES ESPECIAIS PARA BOMBEIROS:**

- Os bombeiros, em caso de incêndio intenso, devem estar vestindo todos os equipamentos de proteção e a unidade de respiração autônoma.
- **Resfriar os tanques criogênicos ou cilindros contendo gases com neblina de água.**
- Estancar algum possível vazamento de dióxido de carbono, fechando as válvulas de linha que possam interromper o fluxo.
- Evacuar a área caso a pintura dos cilindros de dióxido de carbono esteja queimando por insuficiência de resfriamento, ou caso escutem sons fortes de escape de gases.
- Caso a evacuação da área seja necessária, tentar manter o resfriamento por neblina dos tanques e cilindros com o auxílio de um suporte para mangueira que não necessite presença humana.

**6 MEDIDAS DE CONTROLE PARA DERRAMAMENTO OU VAZAMENTO**

**Vazamento em cilindro:**

 <b>GAMA GASES</b>	<b>FISPQ</b> <b>Dióxido de Carbono</b>	FISPQ 07
		Revisão: 02/10/2012
		Página 4 de 8

Não toque no líquido que está vazando. Se não tiver risco pessoal, tente conter o vazamento fechando a válvula do cilindro. Caso esteja em um ambiente confinado, abrir portas e janelas para permitir uma ventilação adequada do local.

**Vazamento em tanques criogênicos:**

Não toque nem caminhe sobre o produto derramado. Contenha o vazamento se isto puder ser feito sem risco. Deixe a substância evaporar. Não jogue água diretamente no ponto de vazamento. Vazamentos descontrolados com respingos de líquido devem ser atendidos por pessoal treinado usando procedimentos pré definidos. EPI adequado deve ser utilizado. Evacuar a área afetada e encaminhar as pessoas para local seguro. Não entrar em áreas cuja concentração do oxigênio esteja abaixo de 19,5% sem a utilização de uma unidade de respiração autônoma. Usar ventilação para reduzir o nível de dióxido de carbono. Localizar e fechar a válvula principal que possa estancar a fonte de vazamento. Atenção, nunca bloquear a válvula de segurança de um tanque criogênico, pois, isto pode ocasionar sua explosão. Proteger as pessoas que estão tentando estancar o vazamento com neblina de água, de modo a reduzir ou desviar a nuvem de vapor. Caso não seja possível estancar o vazamento, permitir que o líquido evapore e o gás se dissipe no local. Isole a área até que o gás tenha se dispersado.

## 7 MANUSEIO E ARMAZENAMENTO

### MANUSEIO

Todas as pessoas envolvidas no manuseio de dióxido de carbono devem estar devidamente treinadas com relação aos riscos do produto e dispor de equipamentos de proteção individual (EPI's), tais como:


- Dióxido de Carbono Líquido: máscaras panorâmicas, luvas de raspa de couro, óculos de segurança para produtos químicos, sapatos de segurança.
- Dióxido de Carbono Gasoso: luvas de raspa de couro, óculos de segurança para produtos químicos, sapatos de segurança com biqueira de aço.

Nunca utilize os cilindros como roletes e evite impactos. Ao utilizar cilindros de dióxido de carbono, procure sempre fixa-los adequadamente de forma a evitar quedas acidentais. Nunca manuseie dióxido de carbono líquido sem a assistência de uma pessoa adequadamente treinada, caso tenha dúvidas, solicite assistência do fornecedor.

Caso esteja utilizando o gás em processos de soldagem, jamais permita que o eletrodo entre em contato com o cilindro. Nunca aqueça os cilindros contendo dióxido de carbono, caso o cilindro congele e a vazão de gás seja insuficiente, jogue água corrente sobre o mesmo.

Os cilindros nunca devem ser diretamente aquecidos por chamas ou vapor. O aquecimento sem controle do cilindro pode causar um aumento de pressão e amolecimento do metal e dependendo das condições a explosão do cilindro. Em cilindros equipados com capote de proteção da válvula semi-aberto, não o remova durante a utilização. Para movimentar os cilindros use os carrinhos de transporte adequadamente projetados para isto. Não role ou escorregue os cilindros. Para rolar cilindros é necessário treinamento. As tubulações, válvulas e outros acessórios devem ser especialmente projetados e limpos



	<b>FISPQ</b> <b>Dióxido de Carbono</b>	FISPQ 07
		Revisão: 02/10/2012
		Página 5 de 8

para este tipo de serviço. Nunca bloqueie válvulas de alívio das linhas. Após o uso, sempre feche a válvula do cilindro.

Sinalizar o local com placas de "Uso Obrigatório de EPI's" bem como as saídas em caso de emergência.

#### ARMAZENAMENTO

O dióxido de carbono é envasado e transportado, em cilindros de aço como gás liquefeito sob sua própria pressão de vapor a aproximadamente 58,2 bar a 21,1 °C.

Os cilindros devem ser estocados em área bem ventilada, o dióxido de carbono possui odor muito leve, similar à água mineral com gás, portanto, você nunca saberá, através do olfato, se houve ou não um vazamento potencialmente perigoso. Armazene-os longe de fontes de calor intenso e materiais inflamáveis ou combustíveis, não os coloque onde exista o risco de entrar em contato com um circuito elétrico, um curto circuito sobre o cilindro pode ocasionar um aquecimento localizado muito elevado comprometendo a resistência da parede do mesmo.

Estoque os cilindros na posição vertical e adequadamente ancorados para evitar queda. Se possível, armazene o produto em área coberta, mantendo os cilindros protegidos da ação das intempéries como sol e chuva. Não remova o capacete de proteção da válvula. Sinalizar o local com placas de "Uso Obrigatório de EPI's" bem como as saídas em caso de emergência.

---

### 8 CONTROLES DE EXPOSIÇÃO E PROTEÇÃO INDIVIDUAL

Medidas de engenharia: use válvulas de retenção para evitar a entrada de água ou de xarope de refrigerante para dentro do cilindro, pois a água em contato com o dióxido de carbono produzirá ácido carbônico extremamente corrosivo podendo causar a ruptura da parte inferior do cilindro.

Em casos onde sejam manipuladas altas quantidades de dióxido de carbono, recomenda-se o uso de ventilação apropriada.

#### LIMITES DE EXPOSIÇÃO

No Brasil o anexo número 11 da Norma Regulamentadora 15 (NR 15) determina a concentração máxima para exposição de 3900 ppm de dióxido de carbono no ar atmosférico.

#### EQUIPAMENTOS DE PROTEÇÃO INDIVIDUAL

##### PROTEÇÃO RESPIRATORIA


Normalmente não é necessária, porém uma unidade de respiração autônoma deve estar disponível nas proximidades em caso onde grandes quantidades de dióxido de carbono sejam manuseados em locais onde o confinamento seja possível.

##### PROTEÇÃO DAS MÃOS

Luvas de raspa de couro para manuseio de gás;  
Para líquido: luvas de material isolante térmico.

##### PROTEÇÃO DOS OLHOS

Para gás normalmente não é necessário;

	<b>FISPQ</b> <b>Dióxido de Carbono</b>	FISPQ 07
		Revisão: 02/10/2012
		Página 6 de 8

Para líquido: máscara panorâmica.

#### PROTEÇÃO DA PELE E DO CORPO

Para gás não é necessário vestimentas especiais;

Para líquido: usar roupas em tecidos que produzam razoável isolamento térmico.

Sapatos com biqueira de aço.

### 9 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

A temperatura ambiente e pressão atmosférica, o dióxido de carbono é um gás não inflamável, incolor, inodoro, e com sabor levemente ácido (idêntico ao da água mineral gaseificada). Uma vez e meia mais denso que o ar atmosférico, é altamente solúvel em água. O dióxido de carbono é envasado e transportado, em cilindros de aço como gás liquefeito sob sua própria pressão de vapor a aproximadamente 58,2 bar a 21,1 °C.

PH	Levemente ácido
Ponto de sublimação a 101,325 kPa	-78,4°C
Ponto de fusão a 101,325 kPa	Não existe
Ponto de fulgor	Produto não inflamável
Limites de explosividade superior/inferior	Produto não inflamável
Pressão de vapor a 21,1°C	58,24 bar
Densidade do gás a 21,1 °C	1,977 kg/m³
Densidade do líquido a 21,1 °C	0,713kg/l
Solubilidade em água a 101,325kPa e 0°C	0,759 cm³/1cm³

### 10 ESTABILIDADE E REATIVIDADE


Estabilidade Química: Estável em um amplo espectro de temperaturas e pressões. Decompõe-se a altíssimas temperaturas.

Condições a serem evitadas: Proteja o cilindro de calor, intempéries, ou danos.

INCOMPATIBILIDADE: Agentes oxidantes fortes.

RISCO DE DECOMPOSIÇÃO: Térmica

RISCO DE POLIMERIZAÇÃO: Nenhum

	<b>FISPQ</b> <b>Dióxido de Carbono</b>	FISPQ 07
		Revisão: 02/10/2012
		Página 7 de 8

#### 11 INFORMAÇÕES TOXICOLÓGICAS

Asfixiante simples, não tóxico.

Não existe histórico de riscos gerados por exposição contínua a baixas ou altas concentrações. O único risco é o de morte pela diminuição da concentração de oxigênio abaixo de 18% em volume no ar atmosférico.

#### 12 INFORMAÇÕES ECOLÓGICAS

Vazamentos de dióxido de carbono armazenado em cilindros são insignificantes.

O vazamento de dióxido de carbono líquido refrigerado, armazenado em grandes tanques criogênicos, forma uma névoa de vapor que será maior ou menor segundo a quantidade de produto, porém, eliminada a fonte de vazamento, o gás se dispersa rapidamente. Ainda que vazamentos de grandes proporções ocorram, não existem riscos de danos ao meio ambiente, além da cumulatividade no efeito estufa.

#### 13 CONSIDERAÇÕES SOBRE TRATAMENTO E DISPOSIÇÃO

Tanques criogênicos ou cilindros contendo resíduos de CO<sub>2</sub> devem ser devolvidos ao fornecedor para disposição do mesmo. Em caso de emergência, o dióxido de carbono pode ser eliminado, assegurando uma ventilação adequada ao local, abrindo lentamente a válvula do cilindro ou válvula de gasoso do tanque e deixando que o gás seja lentamente ventilado.

#### 14 INFORMAÇÕES SOBRE TRANSPORTE

##### TRANSPORTE RODOVIÁRIO

Dióxido de Carbono Industrial

Dióxido de Carbono Super Seco

Número da ONU: 1013

Número de risco: 20

Classe de risco: 2.2 - gases não inflamáveis não tóxicos.

Dióxido de Carbono Refrigerado


Número da ONU: 2187

Número de risco: 22

Classe de risco: 2.2 - gases não inflamáveis não tóxicos.

Para transportar dióxido de carbono, contido em cilindros, o veículo deve possuir carroceria metálica aberta, que permita que os cilindros sejam fixados à mesma, por meio de cintas de amarração, na posição vertical.

Para transportar dióxido de carbono líquido, é necessário que o caminhão esteja equipado com tanque criogênico especialmente desenhado para este fim.

 <b>GAMA GASES</b>	<b>FISPQ</b> <b>Dióxido de Carbono</b>	FISPQ 07
		Revisão: 02/10/2012
		Página 8 de 8

Em ambos os casos, além de estar devidamente sinalizado e equipado com o kit de emergência obedecendo à legislação em vigor, o motorista deve estar de posse do envelope de transporte, onde no campo destinado à transportadora, esteja constando o nome da empresa e contendo a ficha de emergência do produto bem como sua Nota Fiscal.

O motorista deve estar portando: sua carteira de habilitação, o certificado do curso de transporte de produtos perigosos, sua carteira de identidade e o documento do veículo que for utilizar.

A nota fiscal deve conter: o nome do produto, seu número da ONU, sua classe de risco e quando for o caso sua subclasse. Em todas as vias da nota fiscal deve ser impresso a seguinte declaração: *"Declaramos que os produtos relacionados estão adequadamente acondicionados para suportar os riscos normais de carregamento, descarregamento, transbordo e transporte e que atende a regulamentação em vigor, Data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_"*. Esta declaração deve ser datada pelo expedidor.

Caso estejam saindo de um fornecedor, as notas fiscais do fornecedor devem conter exatamente as mesmas informações descritas, além disso, as fichas de emergência devem ser obtidas junto ao fornecedor e devem conter seu o logotipo e endereço.

A nota fiscal do produto, bem como sua ficha de emergência, deve ser dobrada e colocada dentro do envelope de transporte.

#### 15 REGULAMENTAÇÕES

- NBR 11725 Conexões e roscas para válvulas de cilindros para gases comprimidos  
 NBR 12176 Cilindros para Gases - Identificação do conteúdo.  
 NBR 7500 Identificação para o transporte terrestre, manuseio, movimentação e armazenamento de produtos.  
 NBR 7501 Transporte de produtos perigosos – Terminologia  
 NBR 7503 Ficha de emergência e envelope para o transporte terrestre de produtos perigosos – Características, dimensões e preenchimento.  
 NBR 9735 Conjunto de equipamentos para emergências no transporte terrestre de produtos perigosos  
 NBR 14064 Atendimento a emergência no transporte terrestre de produtos perigosos  
 NBR 14095 – Área de estacionamento para veículos rodoviários de transporte de produtos perigosos.

#### 16 OUTRAS INFORMAÇÕES

##### **CUIDADOS ESPECIAIS**

Todo equipamento antes de ser utilizado com Dióxido de Carbono, deve ser previamente pressurizado e possíveis vazamentos detectados através da utilização de água e sabão e eliminados.

Antes do início da utilização de uma nova instalação esta deve passar por um processo de secagem através de purga com nitrogênio seco.

## Anexo 5: Bula do gás medicinal CO<sub>2</sub>



Dióxido de carbono medicinal CO<sub>2</sub>

ATENÇÃO: LEIA O RÓTULO E A BULA ANTES DE UTILIZAR O PRODUTO

Em caso de dúvidas, procure orientação médica ou farmacêutica especializada.

FORMA FARMACÊUTICA E A APRESENTAÇÃO

Gás farmacêutico líquido acondicionado em cilindros.

COMPOSIÇÃO

Princípio ativo: Dióxido de Carbono (CO<sub>2</sub>).  
Cada cilindro contém: CO<sub>2</sub>.....89,0% (vol/vol)  
H<sub>2</sub>O (umidade).....20,0ppm (máx)  
CO.....10 ppm (máx)

AÇÃO  
O dióxido de carbono medicinal também conhecido como gás carbônico, é um gás inodoro, não inflamável, ligeiramente ácido. Resultado do metabolismo respiratório básico dos seres vivos é transportado pelo sangue venoso até os pulmões, onde é realizada a troca gaseosa com o oxigênio, sendo em seguida expirado à atmosfera.

INDICAÇÕES

- Causa insuflação da cavidade abdominal em cirurgias laparoscópicas, por meio de equipamentos adequados.
- Alívio de determinados tipos de soluções chamadas de "intra-vasas".
- Tratamentos dermatológicos em algumas situações, também conhecidos como crioterapia dermatológica.
- Tratamentos específicos de cinto elástico, em procedimentos conhecidos como carbonoterapia.

RISCOS

- Ambientes com altas concentrações de dióxido de carbono medicinal podem ocasionar:
- Sufocamento rápido e súbito por falta de oxigênio no ar ambiente;
- Aumento da taxa de batimentos cardíaco e aceleração do ritmo respiratório;
- Vertigens, sonolência e narcose;
- Danos ao sistema nervoso central em caso de exposição prolongada;
- Irritação, vermelhidão durante o procedimento laparoscópico e em consequência hiperemia gástrica e acidose metabólica devido ao acúmulo de dióxido de carbono no organismo.

MODO DE USO

O dióxido de carbono medicinal é utilizado exclusivamente em ambiente hospitalar, em cirurgias médicas especializadas, sob supervisão de profissionais devidamente habilitados. Deve ser manuseado somente por profissionais devidamente habilitados. Em caso de dúvidas, procure orientação médica.

POSIOLOGIA

Não aplicável para este produto. Seu uso deve ser de exclusiva competência de um médico habilitado.

SUPERDAGEM (DO SE ACIMA DA POSIOLOGIA)

Por medida de segurança, é proibido o transeazamento deste produto do cilindro original para outro.

PARA MAIORES INFORMAÇÕES CONSULTE  
Sua rede de indicações de Segurança de Produtos Químicos FISPQ.  
Sua rede de e-mail: [seguranca@gamagases.com.br](mailto:seguranca@gamagases.com.br)  
Bula do Produto

PRODUTO EXCLUSIVO DE USO MEDICAL

Prazo de validade: 3 anos a partir da data de fabricação.  
Lote e data de fabricação: vide rótulo do cilindro.  
Não utilize dióxido de carbono medicinal após vencido o prazo de validade.

Farmacêutica Responsável:

Arlete Rodrigues do Nascimento - CRF-SP 63182

Gama Gases

CNPJ: 072.819.619.0001-99

Estrada Parque Sade Itajagi, 350 - CEP 06662-070

Cidade: Itajaci - SP

Abrangência: (011) 4452-4000

[www.gamagases.com.br](http://www.gamagases.com.br)

Não aplicável. A superdagem pode ser entendida como uma superexposição ao produto, situação em que poderão se manifestar os riscos já mencionados. Recomenda-se remover o paciente para locais bem ventilados. Em caso de parada respiratória, procedimentos emergenciais de reanimação devem ser aplicados por profissionais capacitados e o paciente poderá ser ventilado com oxigênio medicinal.

REAÇÕES ADVERSAS

Não há evidências de reações adversas ao produto, além dos já mencionados. Não há evidências de toxicidade devido ao uso do produto em condições normais.

INCOMPATIBILIDADES

- Não há evidências de incompatibilidades químicas ou físicas com algum medicamento ou o tema terminado recentemente. Incluiu medicamentos sem necessidade de receita médica.

GRAVIDEZ E LACTAÇÃO

- Comunicar ao seu médico se está gravida ou se suspeita estar grávida, pois dependendo do caso clínico, é possível que o medicamento tenha efeitos não indicados nos procedimentos que utilizem este produto.

CONDIÇÃO DE VEÍCULOS E UTILIZAÇÃO DE MÁQUINAS

- Não aplicável.

ARMAZENAMENTO DO CILINDRO E DO PRODUTO

- Conserve o cilindro em lugar bem ventilado e protegido contra impactos.
- Não armazene o cilindro em ambientes fechados ou confinados devido ao risco de sufocamento.
- Proteja o cilindro contra superaquecimento, danos físicos, arco elétrico e respingos de solda, sob risco de explosão.
- Mantenha o cilindro em temperatura inferior a 52°C.
- Mantenha sempre o cilindro na posição vertical e bem fixado, com a válvula para cima e o capacete arabad, de maneira a impedir seu movimento.
- O dióxido de carbono medicinal encontra-se líquido dentro do cilindro, devido à elevada pressão. Se o cilindro for aberto na posição horizontal, o líquido pode vapor e causar danos.
- Mantenha o produto fora do alcance das crianças.

MANUSEIO DO CILINDRO E DO PRODUTO

- O dióxido de carbono medicinal pode ser usado por pessoal treinado e com equipamento de proteção individual (EPI) adequado.
- Não reabra o cilindro sem lacra, com lacra rompida ou com rotulo ilegível.
- Movimento apenas um cilindro por vez. Antes de movimentá-lo, verifique se sua válvula está fechada.
- Ao carregar ou descarregar o cilindro do caminhão utilize caminho ou plataforma de carga.
- Não utilize o cilindro para enchimento de outros cilindros.
- Suavemente o produto com um regulador de pressão apropriado e equipamentos compatíveis com o produto.
- Não tente reparar equipamento sob pressão.
- Abra a válvula do cilindro lentamente, sem golpeá-la. Quando fora de uso, conserve-a fechada.
- Não é permitido pintar, modificar, desmontar, destruir, remover ou reparar qualquer parte do cilindro, incluindo a válvula, o dispositivo de segurança (se existente) ou outros acessórios.

## Anexo 6: Rótulo “Gama Gases”

<p>Gases Medicinais</p>	
<p><b>Dióxido de carbono Medicinal</b></p>	
<p><b>CO<sub>2</sub></b></p>	
<p><b>DIÓXIDO DE CARBONO - ONU 1013</b>  <b>Gás para insuflação de cavidades abdominais</b>  <b>Concentração: 99%vol/vol (mínimo)</b></p>	
<p><b>ADMINISTRAÇÃO</b>          Insuflação de cavidades abdominais por meio de equipamentos específicos e por profissionais médicos especializados.          Outras aplicações, como em dermatologia, somente por pessoal habilitado e treinado</p>	
<p><b>PRECAUÇÕES</b>          O manuseio deste produto só pode ser feito por pessoal treinado e com equipamento de proteção individual (EPI) adequado. Não receba o cilindro sem lacre, com lacre rompido ou com rótulo ilegível. Movimente um cilindro por vez. Durante a movimentação, mantenha o capacete protetor da válvula totalmente rosqueado ou afixado. Só utilize o produto com um regulador de pressão apropriado e equipamentos compatíveis com o dióxido de carbono medicinal. Nunca reaperte uma conexão rosçada com o sistema pressurizado. Esta operação pode causar acidente sério. Não tente reparar equipamentos sob pressão. Abra a válvula do cilindro devagar, sem golpeá-la. Quando fora de uso conserve-a fechada e com o capacete rosqueado ou afixado. Não é permitido pintar, modificar, deformar, obstruir, remover ou reparar qualquer parte do cilindro, incluindo a válvula, o dispositivo de segurança (caso existente), o capacete fixo ou outros acessórios. <b>Por medida de segurança, é proibido o transvazamento deste produto de um cilindro para outro</b></p>	
<p><b>PERIGO</b>          Contém gás sob pressão. Pode explodir sob efeito do calor.</p>	
<p><b>CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO</b>          Mantenha o cilindro sempre na posição vertical e bem fixado de maneira a impedir seu tombamento. Não role o cilindro deitado. O cilindro não pode ser içado. Somente pode ser armazenado e utilizado em ambiente ventilado e protegido contra intempéries. Proteja o cilindro contra danos físicos, superaquecimento, arco elétrico e respingos de solda, <b>sob risco de explosão</b>. Em caso de vazamento pode causar asfixia.</p>	
<p><b>PARA MAIORES INFORMAÇÕES CONSULTE</b>          Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos - FISPQ. Solicite através do email: <a href="mailto:laboratório@gamagases.com.br">laboratório@gamagases.com.br</a>          Bula do produto</p>	
<p><b>MANTER FORA DO ALCANCE DE CRIANÇAS</b>  <b>Uso sob prescrição médica. Produto exclusivamente de uso medicinal.</b>  <b>Prazo de validade:</b> 3 anos a partir da data de fabricação  <b>Lote e data de fabricação:</b> Consultar etiqueta adicional na calota do cilindro</p>	
<p><b>Farmacêutico Responsável: Arlete Rodrigues do Nascimento – CRF-SP- 63182</b></p>	
<p><b>Gama Gases Especiais Ltda.-CNPJ: 72.819.618/0001-99</b>          Estrada Particular Sadae Takagi,350-CEP09852-070-Cooperativa -São Bernardo do Campo – SP</p>	
<p>Atendimento (011) 4343-4000-www.gamagases.com.br</p>	

## **Anexo 7 : Estudo-Piloto - Tempo de reposição de SP e CGRP após incisão em pele de ratos**

### **Autores:**

Bernardo Hochman, MD, PhD.

Felipe Contoli Isoldi, MD.

Guilherme Lapin, MD.

Paulo Quieregato, MD.

José Octávio, MD.

Michele A. Nishioka

Erica C. R Silva

Gerson Chadi, MD, PhD.

Lydia Masako Ferreira, MD, PhD.

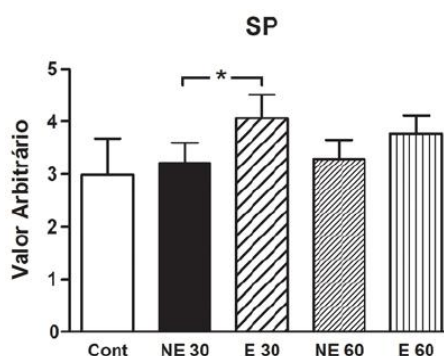
### **Resumo**

**Introdução:** Os principais neuropeptídeos relacionados à inflamação neurogênica na pele são a Substância P (SP) e o Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina (CGRP). A inflamação neurogênica tem sido pesquisada na cicatrização de feridas cutâneas, cada vez mais focando esses neuropeptídeos. Ainda não há dados sobre a disponibilidade desses neuropeptídeos na dinâmica da terminação nervosa, quanto à liberação e reposição dos mesmos após um estímulo nociceptivo. **Objetivo:** investigar o tempo necessário de reposição de SP e CGRP para que as terminações nervosas estejam funcionalmente aptas para um novo estímulo nociceptivo, em pele de ratos. **Métodos:** Foram utilizados 25 ratos Wistar-EPM distribuídos aleatoriamente em 5 grupos. Todos os animais foram submetidos à anestesia geral e tricotomia padronizada do dorso, exceto o grupo controle (CG), no qual o dorso foi tricotomizado após a morte induzida do animal para a determinação dos níveis basais de neuropeptídeos na pele. As amostras de todos os grupos foram colhidas do dorso após 1 minuto da morte de cada animal. Nos grupos Not Stimulated 30 (NS30) e Not Stimulated 60 (NS60), as amostras de pele foram coletadas após 30 e 60 minutos, respectivamente, após a tricotomia e sem estímulo cutâneo. No grupo Stimulated 30 (S30) foi realizada uma incisão (“estímulo incisão”) aos 30 minutos. No grupo Stimulated 60 (S60) foi realizado um estímulo nociceptivo por raspagem subdérmica aos 30 minutos, e aos 60 minutos o “estímulo incisão” no mesmo local (“hiperestimulação nociceptiva”). Nas amostras de pele foram quantificados os neuropeptídeos SP, pró-CGRP e

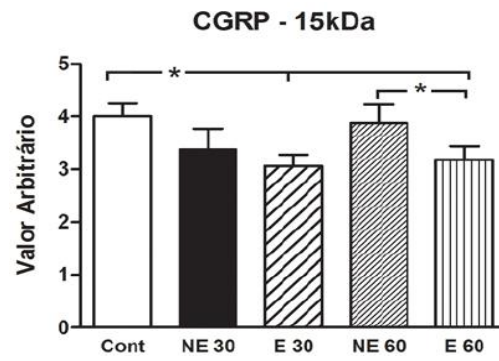
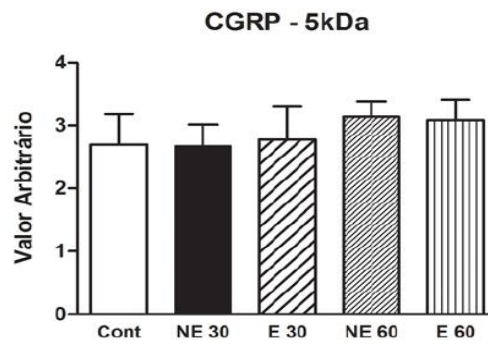
CGRP (forma ativa) por Western Blotting. **Resultados:** O “estímulo incisão” no grupo S30 aumentou (liberou) SP em relação ao grupo NS30 ( $p < 0,05$ ), e o tempo de sua reposição ocorreu em até 30 minutos. O “estímulo incisão” (grupo S30) e a “hiperestimulação nociceptiva” (grupo S60) diminuíram (clivaram) pró-CGRP ( $p < 0,05$ ), sendo assim o seu tempo de reposição maior que 30 minutos. Houve diminuição de pró-CGRP no grupo S30 em relação ao grupo NS30 ( $p < 0,05$ ), demonstrando que sua clivagem ocorreu em até 1 minuto, visto que os animais do grupo S30 sobreviveram 1 minuto a mais que os do grupo NS30 por causa da incisão. Não foi detectada liberação de CGRP nos períodos estudados. **Conclusão:** A reposição da SP ocorre em um período de até 30 minutos e a de pró-CGRP em um período superior a 30 minutos. A clivagem de pró-CGRP ocorre em um período menor de 1 minuto.

**Key words:** SP; CGRP; neurogenic inflammation; neuropeptides; Reaction Time (Tempo de Reação); Temporal Distribution (Distribuição Temporal).

**Gráfico 1 – Valores de SP encontrados para cada grupo**





**Gráfico 2 – Valores de CGRP – 15kDa encontrados para cada grupo****Gráfico 3 – Valores de CGRP – 5kDa encontrados para cada grupo**

## **Anexo 8 : Estudo-Piloto - Desenho experimental para quantificação dos neuropeptídeos cutâneos SP e CGRP com Western Blotting**

### **Autores:**

Guilherme A. F. Lapin,<sup>1</sup> MD; Bernardo Hochman,<sup>2</sup> MD, PhD; Michele Nishioka,<sup>3</sup> Ft.; Jessica R. Maximino,<sup>4</sup> PhD; Gerson Chadi,<sup>5</sup> MD, PhD, Lydia M. Ferreira,<sup>6</sup> MD, PhD

### **Resumo**

A inflamação neurogênica (IN) vem sendo cada vez mais estudada devido a sua importância em processos inflamatórios cutâneos e da cicatrização. Na pele, os efetores da IN são os neuropeptídeos (NP), sendo os mais abundantes o CGRP e a substância P (SP), que estão associados a processos fisiológicos e patológicos. Essas substâncias tem sido pesquisadas na pele utilizando métodos de detecção e quantificação como imunohistoquímica (IHQ), microdiálise (MD) com ELISA e radioimunoensaio (RIE). Cada um desses métodos apresentam vantagens e desvantagens quanto a sensibilidade e especificidade, custo e complexidade técnica. Por outro lado, o Western Blotting (WB) que não possui relatos de uso para detecção de SP e CGRP na pele teria mais acurácia que a IHQ, seria menos oneroso que MD com Elisa e em relação ao RIE necessitaria infraestrutura operacional mais simples. Entretanto, o WB apresenta dificuldades técnicas decorrentes da alta densidade protéica da derme, mas também pela imprecisão que pequenas diferenças no volume da amostra podem acarretar.

Esse estudo descreve um desenho experimental que demonstra como suplantiar os viéses técnicos e incorpora o WB como método reprodutível, tecnicamente viável e de baixo custo para a detecção de SP e CGRP na pele de ratos.

**Palavras-Chaves:** Desenho Experimental; Inflamação Neurogênica; Neuropeptídeos; Substância P; Peptídeo Relacionado com Gene de Calcitonina; Western Blotting.

**Keywords:** Research Design; Neurogenic Inflammation; Neuropeptides; Substance P; Calcitonin Gene-Related Peptide; Western Blotting.

## **FONTES CONSULTADAS**

## FONTES CONSULTADAS

- Bastos EM, Sabino Neto M, Ferreira LM, Garcia EB, Liebano RE, Han YA. Modelo experimental de contratura capsular em implantes de silicone. *Acta Cir Bras.* 2003;18 (Edição Especial):22-8.
- Cabral LM, Ferreira LM, Simões MJ, Mora AO. Modelo experimental de dupla lesão no dorso de ratos, para estudo do processo de cicatrização da pele, utilizando-se a película de celulose. *Acta Cir Bras.* 2003;18 (Edição Especial):65-8.
- Constantine VS, Mowry RW. Selective staining of human dermal collagen: the use of Picrosirius Red F3BA with polarization microscopy. *J Invest Dermatol.* 1968;50:419-24.
- Ferreira ABH. *Miniaurélio século XXI escolar.* 4 ed. Rio de Janeiro: Nova Fronteira; 2001.
- Hochman B, Nahas FX, Oliveira Filho RS, Ferreira LM. Desenhos de pesquisa. *Acta Cir Bras.* 2005;20(Suppl. 2):02-9.
- Marshal BE, Longnecker DE. Goodman and Gilman. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica.* 9 ed, Santiago, Chile: Mc Grawhill, 1996. Capítulo 20, Anestésicos Gerais.; p. 226-42.
- Miranda JA. Normas de Vancouver. *Rev Port Clin Geral* 1997;14:159-74.