

MARIANA MERIDA CARRILLO NEGRÃO

**INSUFLAÇÃO CONTROLADA DE DIÓXIDO
DE CARBONO NA VIABILIDADE DE
RETALHO CUTÂNEO RANDÔMICO
ISQUÊMICO DE RATOS.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

SÃO PAULO

2015

MARIANA MERIDA CARRILLO NEGRÃO

**INSUFLAÇÃO CONTROLADA DE DIÓXIDO
DE CARBONO NA VIABILIDADE DE
RETALHO CUTÂNEO RANDÔMICO
ISQUÊMICO DE RATOS.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

ORIENTADORA: Profa. Dra. LYDIA MASAKO FERREIRA
COORIENTADORA: Profa. FABIANNE MAGALHÃES
GIRARDIN PIMENTEL FURTADO

SÃO PAULO

2015

Merida Carrillo Negrão, Mariana

Insuflação controlada de dióxido de carbono na viabilidade de retalho cutâneo randômico isquêmico de ratos./ Mariana MeridaCarrillo Negrão. --São Paulo, 2015.

XXVI,100f.

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

Título em inglês: Controlled insufflation of carbon dioxide in the viability of random skin flaps of rats

1. Dióxido de Carbono; 2. Insuflação; 3. Pele; 4. Ratos; 5. Isquemia.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

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

COORDENADOR: Prof. Dr. MIGUEL SABINO NETO

DEDICATÓRIA

DEDICATÓRIA

Dedico a primeiramente; a Deus! Por conduzir minha vida, me dar forças e saúde para seguir minha caminhada e permitir a realização de todos meus sonhos.

À minha família, meu marido Marcio Negrão, por todo companheirismo e apoio. Pelo suporte em nossa casa com nossa filha, sem você eu jamais teria conseguido concluir esse sonho. À minha filha Manuela, que nasceu no meio de todo esse turbilhão, por me ensinar que as coisas simples da vida são as mais importantes, por me tornar uma pessoa melhor, por me motivar a ser exemplo de pessoa e profissional. Aos dois, por ser luz na minha vida e por entenderem meus momentos de ausência para que esse projeto fosse concluído.

À minha família como um todo, tios, padrinhos, primos, por serem meu refugio e minha segurança, sem dúvida o exemplo de vocês foi definitivo na minha vida.

Em especial a minha mãe Tania Lemos, que desde pequena me incentivou a estudar e nunca desistir, a sonhar alto e conseguir conquistar meus sonhos, por sua integridade, por sua força, por ser guerreira e sustentar nossa casa com o que há de melhor: paz e muito amor. Sem você amada mãe, nada disso seria possível. Em você eu me inspiro.

À minha irmã gêmea Camila, por todo apoio, por me incentivar na busca por estudos científicos, por me ajudar sempre e ser meu porto seguro e falar as coisas que preciso ouvir. Nossa ligação é eterna. Amo vocês!

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), Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Plástica da UNIFESP (1993 a 2012) e orientadora deste trabalho, por ter me orientado durante todo o estudo sempre com palavras de incentivo e críticas construtivas, acreditando no meu potencial e no trabalho. Por lutar pela Medicina Baseada em Evidências e dessa forma me abrir os olhos para um conhecimento ético e científico. Grata por ter partilhado de todo seu conhecimento e ter aprendido com a senhora o que é ser pesquisadora.

Ao **PROF. BERNARDO HOCHMAN** (*in memoriam*), Professor Orientador do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Plástica da UNIFESP, que me aceitou como co-orientanda desde o início, que me motivou e me incentivou o tempo todo, que leu e releu o trabalho várias vezes, mas que de uma forma inesperada e precoce nos deixou. A falta que o senhor faz é imensurável assim como minha gratidão por ter conhecido e convivido com um ser humano tão simples e sábio.

À **PROFA. FABIANNE MAGALHÃES PIMENTEL FURTADO**, Professora e co-orientadora do Programa de Pós Graduação em Cirurgia Translacional, por toda ajuda com suas correções que somente vieram acrescentar nesse trabalho.

À querida colega **MICHELE AKEMI NISHIOKA**, fisioterapeuta, mestre em Ciências da Saúde pelo programa de Pós-Graduação em Cirurgia Plástica da UNIFESP, por ter me ensinado o manejo com os animais e me mostrado o sentido da pesquisa. Agradeço demais por ser exemplo para mim.

Ao meu amigo **DR. LUIZ JOSE MUACCAD GAMA**, médico cirurgião plástico e colega desde o primeiro dia no aperfeiçoamento, por sua amizade, por sua parceria, por todo apoio na cirurgia dos animais, por ser meu ombro amigo durante todos esses anos de luta para finalizar esse projeto. Sem dúvida nenhuma sua amizade foi uma das coisas mais importantes que adquiri ao longo desse processo todo. E que nossos filhos, nascidos em meio a esse projeto, sejam tão amigos com nós somos.

À amiga **CAMILA PALAZZI**, fisioterapeuta aluna do programa de Mestrado da Cirurgia Translacional da UNIFESP, por toda sua disponibilidade em me ajudar no manejo dos animais, abdicando de seu precioso tempo para me auxiliar nesse processo. Jamais esquecerei o que fez por mim. Muito grata por tudo.

À amiga **ERICA CALCAGNO RAYMUNDO DA SILVA**, fisioterapeuta, mestre em Ciências da Saúde pelo programa de Pós-Graduação em Cirurgia Plástica da UNIFESP, por ter me apresentado o programa de Pós-Graduação e me auxiliar em todo o processo desde o início.

À amiga **TAIS AMADIO MENEGAT**, fisioterapeuta, aluna do programa de Pós-Graduação em Cirurgia Plástica da UNIFESP, por ter sido minha companheira nos três anos de aperfeiçoamento, por ter me auxiliado no projeto piloto, por ter me incentivado a nunca desistir do meu sonho.

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**.

A toda equipe do biotério, em especial **DRA HELGA C. A SILVA**, coordenadora do Centro de Experimentação Cirúrgica (CEC) Prof. Dr. Saul Goldenberg por todo suporte para que essa pesquisa pudesse ser realizada.

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

ΕΠΙΓΡΑΦΕ

*"Que os vossos esforços desafiem
as impossibilidades, lembrai-vos de
que as grandes coisas do homem
foram conquistadas do que parecia
impossível."*

(Charles Chaplin, 1969)

SUMÁRIO

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	VI
AGRADECIMENTOS	VIII
EPÍGRAFE	XII
SUMÁRIO	XIV
LISTA DE FIGURAS	XVII
LISTA DE TABELAS	XX
LISTA DE GRÁFICOS	XXII
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	XXIV
RESUMO	XXVI
1. INTRODUÇÃO	2
2. OBJETIVO	5
3. LITERATURA	7
4. MÉTODOS	22
4.1. Desenho de pesquisa	22
4.2. Amostra	22
4.3. Delineamento experimental	23
4.4. Técnica operatória	24
4.5. Equipamento	30
4.6. Procedimento de aplicação da técnica	33
4.7. Exérese da amostra e análise microscópica	34
4.8. Análise macroscópica da área necrosada	35
4.9. Análise estatística	36
5. RESULTADOS	39

6.DISSCUSSÃO	50
7.CONCLUSÃO	62
8.REFERÊNCIAS	64
NORMAS ADOTADAS	72
ABSTRACT	75
APÊNDICES	77
Apêndice 1	77
Apêndice 2	84

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Distribuição dos grupos do estudo	22
FIGURA 2 – Marcação da área a ser epilada	24
FIGURA 3 – Rato Wistar-EPM submetido a epilação digital	26
FIGURA 4 – Marcação da área de realização do retalho cutâneo na região dorsal	27
FIGURA 5 – Retalho cutâneo incisado no dorso do rato	27
FIGURA 6 – Deslocamento do retalho cutâneo contendo pele e panículo carnosos	28
FIGURA 7 – Vista superior após colocação da barreira plástica sobre o leito da área doadora do retalho cutâneo	29
FIGURA 8 – Vista lateral após a colocação da barreira plástica sobre o leito da área doadora do retalho cutâneo	29
FIGURA 9 – Retalho cutâneo randômico dorsal suturado	30
FIGURA 10 – Equipamento utilizado para aplicação da técnica nos animais	31
FIGURA 11 – Delimitação da área de penetração da agulha	32
FIGURA 12 – Pontos de aplicação da técnica	33
FIGURA 13 – Detalhe da limitação da penetração da agulha	34
FIGURA 14 – Exérese das amostras	35

FIGURA 15 – Fotomicrografia da amostra corada em HE (10x)	43
FIGURA 16 – Fotomicrografia da amostra corada em HE (10x)	44
FIGURA 17 – Fotomicrografia da amostra corada em HE (10x)	45

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Distribuição dos ratos por camadas atingidas, de acordo com o grupo	38
TABELA 2 - Distribuição dos ratos por infiltrado inflatório, vascularização, ulceração, de acordo com o grupo	39
TABELA 3 - Medidas-resumo da porcentagem de área necrosada por grupo	40

LISTA DE GRÁFICOS

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - Distribuição dos ratos por camadas atingidas, de acordo com o grupo	38
GRÁFICO 2 - Porcentagem de presença de infiltrado inflatório, vascularização e ulceração por grupo	40
GRÁFICO 3 - Intervalo de Confiança de 95% para média da porcentagem de área necrosada por grupo	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS

CEDEME	Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia
cm	Centímetros
CO ₂	Dióxido de Carbono
DAP	Doença Arterial Periférica
EPM	Escola Paulista de Medicina
min.	Minuto
ml	Mililitro
°C	Graus Celsius
PaCO ₂	Pressão Arterial de Dióxido de Carbono
PaO ₂	Pressão Arterial de Oxigênio
pH	Potencial de Hidrogênio
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo
USP	Universidade de São Paulo

RESUMO

RESUMO

Introdução: O retalho cutâneo é um procedimento cirúrgico frequente na cirurgia reparadora. Dentre as diversas técnicas que podem ser utilizadas para minimizar os problemas com necrose pode-se mencionar a utilização da insuflação controlada de dióxido de carbono, carboxiterapia, que constitui-se de uma técnica na qual se utiliza o gás carbônico medicinal (Dióxido de Carbono, anidro carbônico ou CO₂) injetado no tecido subcutâneo, estimulando assim efeitos fisiológicos como melhora da circulação e oxigenação tecidual. A literatura sobre essa técnica é escassa e precária.

Objetivo: Verificar o efeito da insuflação controlada de dióxido de carbono na viabilidade do retalho cutâneo randômico isquêmico em ratos. **Métodos:**

Estudo experimental, randomizado, unicego realizado com 36 ratos Wistar-EPM randomizados em três grupos. Grupo controle, grupo 2 com insuflação controlada de dióxido de carbono e grupo 3 com insuflação de gás inerte, insuflados por cinco segundos sob um fluxo 150ml/min, a 90 graus em relação à pele com perfuração da agulha de 0,2 mm determinada através de projeto piloto, em dois pontos distando 2,5cm e 7,5cm, respectivamente, da base cranial do retalho. O procedimento de insuflação foi realizado durante sete dias consecutivos. Foram realizadas análises macroscópicas (área necrosada) e microscópicas do processo de vascularização através da coloração hematoxilina e eosina. **Resultados:** Não houve diferença estatisticamente significativa para os parâmetros vascularização, infiltrado inflamatório e área necrosada. **Conclusão:** A insuflação controlada de dióxido de carbono não altera a viabilidade do retalho randômico isquêmico de ratos

Palavras-chave: dióxido de carbono, insuflação, pele

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O retalho cutâneo é um procedimento cirúrgico frequente na cirurgia reparadora que pode apresentar problemas em relação à viabilidade (UGLAND, 1966; KAUFFMAN *et al.*, 1985; FREITAS & PARDINI, 1993; PRADO *et al.*, 2006; PINFILD *et al.*, 2005, NISHIOKA, 2012). A isquemia e a necrose, devido ao escasso suprimento sanguíneo ao longo do retalho, são os principais fatores que podem levar à falha.

A necrose pode ocorrer devido a fatores intrínsecos e extrínsecos, aos primeiros está associada a diminuição do fluxo sanguíneo; aos segundos, fatores sistêmicos (hipotensão, arteriopatias e infecção), locais (compressão, temperatura e tensão) e técnicos (planejamento e execução) (KERRIGAN, 1983; FERREIRA, ANDREWS, LAREDO FILHO, 1995; ESTEVES JUNIOR *et al.*, 2005). Esse tipo de complicação eleva os custos do tratamento, ocasiona retardo do retorno dos pacientes às atividades de vida diária, e muitas vezes, o aspecto estético final fica comprometido.

Diversos estudos vêm sendo realizados na tentativa de minimizar a isquemia e a necrose (BARTHE, SUAREZ, ORTEGA, 1991; FREITAS & PARDINI, 1993; DUARTE, GOMES, FERREIRA, 1998; LIEBANO, FERREIRA, SABINO, 2003; HARDER *et al.*, 2004; ABLA *et al.*, 2005; BRANCO, *et al.*, 2005; PRADO, 2006; NISHIOKA, 2012). Nesse sentido, diversos agentes físicos vem sendo utilizados com o intuito de aumentar o aporte sanguíneo (KERRIGAN, 1983; FERREIRA, 1995; HARDER *et al.*, 2004; ESTEVES JUNIOR *et al.*, 2005; NISHIOKA, 2012).

A despeito da enorme controvérsia, a utilização da insuflação controlada de dióxido de carbono, carboxiterapia, se constitui em uma técnica na qual se utiliza o gás carbônico medicinal (dióxido de carbono, anidro carbônico ou CO₂) injetado no tecido subcutâneo, estimulando assim

a melhora da circulação e oxigenação tecidual (SCORZA & BORGES, 2008).

O mecanismo de ação do gás carbônico é, sobretudo, na microcirculação vascular do tecido conectivo, promovendo uma vasodilatação e um aumento da drenagem venolinfática (BRANDI *et al.*, 2001; TORIYAMA *et al.*, 2002). Com a vasodilatação, é obtida uma melhora de fluxo de nutrientes, entre eles, as proteinases necessárias para remodelar os componentes da matriz extracelular e para acomodar a migração e reparação tecidual (TORIYAMA *et al.*, 2002; BRANDI *et al.*, 2004; SOMEZ *et al.*, 2009).

Assim, SOMEZ *et al.* (2009) avaliaram a aplicação de insuflação controlada de dióxido de carbono no pré-operatório de retalho cutâneo randômico de ratos de pedículo superior e dorsal. Foi realizado um grupo com aplicação de ar ambiente e outro com dióxido de carbono para comparação da viabilidade do retalho. Angiogênese foi observada no grupo com aplicação de dióxido de carbono na região onde foi feito o retalho, porém não houve melhora significativa na viabilidade do mesmo. Houve também aumento de mastócitos, polimorfonucleares, células características de resposta inflamatória.

No estudo acima não foi utilizada a aplicação de dióxido de carbono no pós-operatório. Sendo assim, o presente estudo pretende investigar o efeito da insuflação de dióxido de carbono na viabilidade do retalho cutâneo randômico.

OBJETIVO

2. OBJETIVO

Verificar o efeito da insuflação controlada de dióxido de carbono na viabilidade do retalho cutâneo randômico em ratos.

LITERATURA

3. Literatura

Mc FARLANE, DEYOUNG, HENRY (1965) propuseram o modelo experimental de retalho cutâneo dorsal do rato de base cranial, de 10 x 4 cm, para estudar a necrose dos mesmos. Observaram necrose em 94,3% dos animais, com média de 25 a 50% da área.

KERRIGAN (1983) realizou um estudo experimental em porcos cujo objetivo era investigar os mecanismos fisiopatológicos de necrose do retalho cutâneo e evidenciou que a insuficiência arterial do retalho é o fator intrínseco mais importante no mecanismo de formação da necrose. Ressaltou no estudo a importância de tratamentos que aumentem a vascularização do retalho.

ASAI *et al.* (1997) propuseram um modelo de retalho cutâneo dorsal no rato de base caudal. Os resultados mostraram necrose de 50%, em uma área de 2x7cm, sem interposição de barreira plástica.

JANSEN *et al.* (1999) usaram modelo dorsal de base cranial sem interposição de barreira plástica em ratos e encontraram necrose de 40% no 7º dia de pós-operatório.

SAVIN *et al.* (1995) realizaram um ensaio clínico randomizado e duplo-cego com aplicação transcutânea de CO₂ em dez portadores de insuficiência venosa crônica de membros inferiores. Compararam a aplicação com vapor de água saturado e o vapor de CO₂ e determinaram: fluxos de sangue femoral, braquial; pressão da artéria tibial posterior;

frequência cardíaca; e tensão de oxigênio transcutânea no pé (TcPO₂). O Fluxo femoral, a pressão tibial, e a TcPO₂ aumentaram significativamente após a exposição da pele à água rica em CO₂. O grupo com vapor de água saturado não teve qualquer efeito. Concluíram que houve um aumento significativo na pressão parcial do oxigênio confirmando o efeito Bohr causado pela aplicação do gás.

SOBANSKI (1989) realizou um ensaio clínico randomizado e controlado com 102 pacientes portadores de doença arterial periférica. Dois grupos de 51 pacientes foram formados sendo que um grupo recebeu tratamento com água carbonada e outro grupo recebeu insuflação controlada de CO₂. Foram realizadas 18 aplicações em cinco semanas sendo quatro puncturas com volume de 50ml por quilo de peso do paciente. Foram avaliadas distâncias percorrida sem dor, a pé e com bicicleta e impedância com pletismógrafo. Não foi encontrada diferença significativa entre os dois grupos. Ambos os grupos apresentaram melhora em todos os aspectos mensurados e concluem que a técnica é segura e efetiva para patologias arteriais periféricas.

WESTPHAL (1991) realizou um ensaio clínico randomizado com 80 pacientes portadores de enxaqueca. Não houve homogeneidade na amostra. O estudo mostra que há diferença significativa entre o tratamento realizado por aplicação de água carbonada e a infusão controlada de CO₂, sendo a primeira mais efetiva. Foram realizadas 10 sessões, com um dia de intervalo, por duas semanas. Não é relatado acerca do volume e do fluxo de gás injetável. Foi mensurada melhora do estado geral, intensidade das crises, uso de medicações de ataque e afastamento do trabalho pela enxaqueca.

BROCKOW *et al.* (2000) realizaram uma revisão sistemática e concluíram que a pouca quantidade de artigos de alta qualidade

metodológica encontrado, impede conclusões definitivas sobre a eficácia da insuflação controlada de CO₂ e sugerem que sejam realizados mais ensaios clínicos randomizados de alta qualidade.

BRANDI *et al.* (2001) fizeram um amplo estudo com a injeção subcutânea de CO₂ do tipo ensaio clínico controlado, randomizado e duplo cego com 48 pacientes do sexo feminino com idade média de 34 anos com adiposidade localizada em coxas, quadris e abdome. As aplicações foram feitas duas vezes por semana, durante três semanas consecutivas no abdome e nas coxas. A velocidade do fluxo foi de 50ml CO₂/min e o volume injetado para abdome foi de 300ml e nas coxas de 150ml. Foi mensurada a perfusão tecidual 30 minutos antes da aplicação e logo após as aplicações através do laser Doppler, com as pacientes na mesma posição e sob a mesma temperatura. Como resultado foi apontado o aumento da perfusão tecidual (à Dopplerfluxometria), aumento da pressão parcial de oxigênio - PO₂ e redução da circunferência das áreas tratadas (efeito lipolítico). Nesse mesmo estudo, os autores realizaram exame histopatológico das áreas tratadas e relataram ter encontrado aumento da espessura da pele, fratura da membrana do adipócito e preservação total do tecido conectivo, incluindo-se estruturas vasculares e nervosas. Não há descrição de como foi feita a biopsia e nem do local onde foi retirada a amostra de pele.

BRANDI *et al.* (2004) avaliaram neste estudo os efeitos da terapia com dióxido de carbono sobre irregularidades na pele após lipoaspiração. 42 mulheres foram divididas em três grupos. Grupo A com lipoaspiração somente; grupo B lipoaspiração associada a aplicação do CO₂; e grupo C somente aplicação de CO₂. Foram realizadas duas sessões semanais de insuflação controlada de dióxido de carbono, durante 10 semanas, numa

velocidade de fluxo de 100mlCO₂/min e um volume de 300 ml após a lipoaspiração e somente esse tratamento ao grupo C. Para análise dos resultados fizeram perimetria e medida com um cutometer. Os autores relatam a obtenção de melhoras nas irregularidades da pele; Foi relatado um acompanhamento de 3 meses para identificar possíveis complicações e relatam apenas a dor, as equimoses e a sensação de crepitação (leves e transitórias) .O estudo demonstrou diminuição da medida de circunferência do grupo tratado com o CO₂, e melhora da elasticidade da pele. Não houve análises histológicas e os grupos não estavam homogêneos.

WOLLINA *et al.* (2004) realizaram um estudo retrospectivo. Em quatro anos trataram 86 pacientes (52 mulheres e 34 homens) com feridas crônicas (úlceras venosa crônica, úlceras neuropáticas, escaras, úlceras reumáticas) com aplicação transdérmica de CO₂ por 30 minutos uma vez por dia por uma semana. Os achados apontam para uma mudança positiva na microcirculação e subsequente melhoria no tecido de granulação em apenas uma semana de aplicação e recomendam a aplicação para redução do risco de infecção em úlceras crônicas. Não foi feito análise histológica para avaliação, apenas achados clínicos e questionários de satisfação dos pacientes. O tratamento foi bem tolerado e nenhum efeito adverso foi encontrado. Os autores recomendam estudos de maior qualidade metodológica.

FERREIRA, HADDAD, TAVARES (2008) em um estudo piloto, cego, experimental e transversal, com análise qualitativa dos resultados, investigaram injeção de CO₂ na derme de ratos Wistar. Foram utilizados dez ratos que foram submetidos a uma biópsia da pele um dia antes do procedimento. Em quatro animais realizaram a insuflação controlada de

dióxido de carbono introduzindo somente a lança do bisel com um fluxo de 20 mmHg. O volume injetado foi o suficiente para formar a pápula branca no tecido demarcado e foram realizadas um total de 6 sessões consecutivas. No lado esquerdo dos mesmos animais foi realizada a insuflação controlada de dióxido de carbono de forma subcutânea com apenas 3 mm da agulha introduzida no tecido e o fluxo de 20mmHg. O volume injetado foi o suficiente para distender o tecido na área demarcada. Outros quatro animais da mesma foram utilizados como controle e foi injetada solução salina a 0,9% suficiente para distender o tecido. No sexto dia após as aplicações, amostras de tecido foram retiradas e analisadas histologicamente e foram avaliadas as alterações morfológicas (quantidade e arranjo) para as fibras de colágeno da derme e comparadas entre os grupos. Os animais tratados com insuflação controlada de dióxido de carbono apresentaram *turn over* de colágeno em suas amostras de pele em comparação com o grupo controle, que teve injeções de solução salina. Relatam ainda que a aplicação intradérmica apresentou melhores resultados que a aplicação subcutânea. Os autores sugerem que sejam realizadas pesquisas que abordem a profundidade da aplicação, volume de gás bem como o intervalo entre as sessões.

SCORZA & BORGES (2008) realizaram um estudo de revisão bibliográfica sobre o tema e pesquisaram em bases de dados e consideram esses estudos publicados nessas bases como científicos. Concluem que a técnica de carboxiterapia é considerada um recurso seguro sem efeitos adversos (ZWAAN, 1996) ou complicações importantes (BRANDI *et al.*, 2004; BROCKOW *et al.*, 2000).

ABRAMO *et al.* (2009) realizaram um ensaio clínico com 10 pacientes de ambos os sexos (7 mulheres e 3 homens) e idades variando de 27 a 65 anos, para verificar o aumento de temperatura local mediante aplicação da infusão controlada de CO₂. A temperatura foi mensurada

através de um termômetro digital encostado na pele, antes e após a aplicação do gás. O volume aplicado por punctura foi de 1,5 ml/kg de peso, fluxo ou pressão do gás de 80 ml e velocidade de infusão de 80 ml/min. Foram realizadas biópsias na pele, antes e logo após a infusão controlada de dióxido de carbono, para avaliação histológica da vasodilatação periférica e da microcirculação cutânea. Vale ressaltar que o estudo não relata ter aprovação pelo comitê de ética. Os fragmentos retirados apresentaram 0,5 cm² e foram fixados em parafina e corados com hematoxilina eosina. A leitura das lâminas foi determinada por microscopia ótica comum usando uma objetiva com aumento de 40X. Relatam um aumento de 3,24 vezes no tamanho do vaso após a aplicação e que o volume de gás infundido não interfere no aumento de temperatura, Concluem que a temperatura aumentou em razão da vasodilatação e do aumento do fluxo sanguíneo local. Não relata efeitos colaterais após aplicação da técnica.

SOMEZ *et al.* (2009) realizaram um estudo com 30 ratos Wistar para verificar a influência da carboxiterapia no pré-operatório de retalho cutâneo isquêmico randômico dorsal. Dividiram os animais em três grupos. No primeiro aplicaram carboxiterapia; no segundo ar ambiente; e no terceiro nenhuma terapêutica foi aplicada (controle). Realizaram uma marcação onde seria futuramente realizado o retalho uma área de 3x9cm, e aplicaram em dois pontos distando 3cm e 9 cm da base cranial, de forma subcutânea. Não é mencionada angulação de agulha nem a profundidade. Cada ponto foi perfundido por 5 segundos num fluxo de 175ml/min de gás. As sessões foram feitas por sete dias consecutivos. No oitavo dia, realizaram o procedimento de retalho cutâneo. Amostras de tecido foram colhidas a uma distancia de três cm da base cranial e analisadas com coloração de hematoxilina-eosina, azul de toluidina. Em relação à área viável do retalho não houve diferença significativa entre os três grupos. O dado mais

significante foi o aumento de neovascularização no grupo tratado com CO₂ em relação aos demais grupos. Foi observado também um aumento de fibroblastos, mastócitos e PMLs o que sugere uma resposta inflamatória no grupo tratado com CO₂. Os autores sugerem que seja realizado um trabalho para verificar se o efeito da resposta inflamatória causada minimiza os benefícios da neoangiogênese encontrada no grupo tratado.

BALIK, YILMAZ, BAGRIYANIL (2010) desenvolveram um estudo experimental, randomizado, primário, unicego com análise histomorfológica e com medidor de fluxo laser Doppler para monitorar o efeito da injeção controlada de CO₂ no tecido adiposo de ratos. Dividiram 28 ratas Wistar em cinco grupos sham, aplicação de CO₂ e ar ambiente (agudo e crônico). Eles compararam efeitos bioquímicos de CO₂ e ar ambiente. Mensuraram o tempo de distensão dos tecidos em todos os grupos e o fluxo sanguíneo. Não houve diferença significativa entre os grupos de ar respirável e CO₂ no fluxo sanguíneo porém no número dos adipócitos houve. Sugerem que os efeitos mecânicos da injeção do gás são mais importantes que os efeitos metabólicos.

BRANDI *et al.* (2010) realizaram um ensaio clínico randomizado com 70 pacientes (45 homens e 25 mulheres, com idade média de 66 anos) portadores de lesões vasculares crônicas em membros inferiores. Foram distribuídos em dois grupos homogêneos de 35. Foi aplicado a insuflação controlada de CO₂ e curativos em um grupo; no outro, apenas curativos. Todas as lesões cutâneas foram tratadas com os métodos de rotina, envolvendo a análise cirúrgica e / ou debridamento químico com cultura para terapia antibiótica-alvo, e o uso de curativos de acordo com as características de cada lesão (hidrogéis, alginatos). A insuflação de dióxido de carbono foi usada duas vezes por semana, durante seis semanas, com início no primeiro dia de tratamento com agulha de 30G^{1/2} na borda das feridas com volume de

100ml/min num total de 50 ml por área. O aumento microcirculação foi medido por Laser Doppler Perimed Peri flux® (fluxometria). Não houve diferença entre os grupos, porém o tempo de fechamento da ferida foi menor no grupo onde foi aplicado o dióxido de carbono e os autores relatam que por não haver complicações a técnica pode ser aplicada em pacientes com hipóxia tecidual.

ABRAMO & TEIXEIRA (2011) realizaram um estudo com 10 pacientes com úlceras crônicas causadas por insuficiência venosa em membro inferior, sendo 7 do sexo feminino, 3 do sexo masculino com idade média de 56 anos e tempo médio de ferida de 12,5 meses. Objetivaram verificar o efeito a insuflação controlada de dióxido de carbono. Foram realizadas dez sessões com a agulha inserida na direção do tecido de granulação, distando 0,5 da margem e 2,5 entre si. A profundidade da agulha não foi relatada. O número total de puncturas variou de acordo com o tamanho da lesão. O fluxo utilizado foi de 80ml/minuto e o volume injetado foi de 1,5ml/kg do paciente por punctura/sessão. As sessões foram realizadas com intervalos de 72 horas. Biópsias foram realizadas antes da aplicação da primeira sessão, após a terceira, a quinta e a décima sessão, as amostras foram coradas com hematoxilina eosina e a contagem histológica foi feita pelo programa *Weibel*. Os resultados obtidos foram que número de capilares foi significativamente maior ($p < 0,01$) no membro inferior direito após infusão de CO₂ e também, significativamente maior ($p < 0,01$) no membro inferior direito em relação ao membro inferior esquerdo. O número de macrófagos e fibroblastos foi significante maior ($p < 0,05$) no membro inferior direito Não houve diferença significativa nas dimensões da ferida antes e após a insuflação. Com esse pequeno número de pacientes, sem uniformidade de pacientes e de lesões os autores sugerem que o aumento da concentração do CO₂, assim como a elevação do hidrogênio iônico, liberado

na reação do CO₂ com a H₂O, no local da infusão, são responsáveis pela diminuição do pH, desencadeando respostas inflamatórias de natureza diversa nos tecidos infundidos. É importante salientar que no estudo não há relatos sobre aprovação do mesmo em comitê de ética.

COSTA *et al.* (2011) realizaram ensaio clínico prospectivo acerca do resultado da insuflação de CO₂ em adipócitos da parede anterior do abdome. Foram realizadas seis sessões de insuflação controlada de dióxido de carbono no abdome, com fluxo de 80ml/min, com puncturações a cada dois cm em toda área demarcada. A agulha foi introduzida a dois cm de profundidade e o volume foi calculado pelo tempo de oito segundos de aplicação em cada ponto. Foi realizada biópsia com análise histológica antes e após as seis sessões (com intervalo de dois dias entre as mesmas) e os fragmentos foram corados com Hematoxilina Eosina. O estudo histológico pós-tratamento demonstrou reduções citométricas nos adipócitos, de maneira uniforme com relação à área, diâmetro médio, perímetro, comprimento, largura e a razão comprimento/largura. Os resultados obtidos sugerem que a infiltração de CO₂ no volume, fluxo, tempo, número de sessões e intervalos propostos, foi capaz de reduzir o número e diminuir os valores das variáveis citométricas dos adipócitos localizados na parede anterior do abdome de mulheres saudáveis e atribuem esses resultados ao aumento vasodilatação local e aumento de metabolismo. Ressaltam que a técnica é minimamente dolorosa e sem complicações.

BALIK *et al.* (2011) realizaram um estudo experimental em 18 ratos fêmeas e relatam que não há diferenças significativas entre o gás inerte e o dióxido de carbono e que os efeitos de distensão mecânica parecem ter mais importância que os efeitos bioquímicos.

FERREIRA *et al.* (2012) relatam a grande dificuldade em encontrar estudos metodologicamente adequados e com rigor científico em relação ao uso da insuflação controlada de dióxido de carbono na área da dermatologia e cirurgia plástica que possibilite conclusão. Avaliaram quinze ensaios controlados com alocação aleatória e nenhum deles possuía metodologia adequada e citam que para que as conclusões a respeito da técnica tenham credibilidade são necessários estudos com critérios de inclusão, não inclusão e exclusão bem determinados, com universo homogêneo e metodologia de avaliação com rigor científico.

LYRA *et al.* (2012) realizaram um estudo com 24 ratos Wistar, com queimaduras de água quente (expostos 10 segundos a uma temperatura de 70 graus). Foram divididos em três grupos, um controle, um com tratamento duas vezes por semana e outro grupo com tratamento três vezes por semana. Foi aplicado de 10 a 20 ml de gás porém não descrevem angulação de agulha e tempo de punctura. Os animais foram sacrificados a cada 3 nos dias 0; 3; 7; 10; 15; 21; 30 e 90 após a queimadura. Foram verificados em análise histológica, a proliferação de fibroblastos, neovascularização, proliferação de folículos pilosos, infiltrado inflamatório linfocitário e neutrofílico. Foram atribuídas notas de 0 a 4 cruces para cada critério. Não houve diferença significativa no uso da carboxiterapia nos critérios estudados, afirmaram por fim que o tema carece de estudos com consistência em relação ao uso da técnica.

RAYMUNDO *et al.* (2014) realizaram um estudo primário, intervencional, experimental, aleatorizado, unicego e controlado com 56 ratos divididos em 4 subgrupos. Foi aplicado dióxido de carbono para verificar ação na secreção de neuropeptídeos CGRP e SP em pele de ratos.

Compararam a ação do gás atmosférico, dióxido de carbono e o grupo controle. Injetaram 8ml de gás, por 10 segundos num fluxo de 80ml/min. Ambos os gases diminuem a secreção dos neuropeptídeos, não havendo diferença entre eles. Ressalta que a técnica poderia trazer benefícios como um complemento terapêutico pela modulação da secreção de neuropeptídeos, no controle de doenças cutâneas de origem neuropeptidérgica, como psoríase, mas que são necessários maiores estudos para se definir as consequências das atividades imunomoduladoras e vasodilatadoras do CGRP, assim como sua real função na cicatrização

PENHAVEL *et al.* (2013) realizaram um estudo randomizado com dezesseis ratos Wistar machos adultos. Foram realizadas feridas através de punch no dorso dos animais. O grupo controle não recebeu nenhuma terapêutica enquanto que o grupo tratado recebeu a terapia de dióxido de carbono no terceiro, sexto e nono dia. Não há descrição em relação à quantidade de gás insuflado, volume, tempo e angulação da agulha. Os animais foram sacrificados no 14º dia e as amostras de pele retiradas, coradas como Hematoxilina e Eosina e posteriormente analisadas microscopicamente. Foram quantificados: colágeno, fibroblastos e leucócitos polimorfonucleares. Infiltrado mononuclear foi analisado e classificado numa escala de 0 a 3. Foram avaliados os diâmetros das feridas macroscopicamente através de fotos e programa Image J®. Concluíram que

a terapia de dióxido de carbono não teve nenhum efeito sobre a cicatrização de feridas cutâneas agudas induzidas em ratos.

MÉTODOS

4. MÉTODOS

4.1. Desenho de pesquisa

Trata-se de um estudo primário, experimental, longitudinal, analítico, prospectivo, randomizado, unicego, realizado em centro único.

O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) sob número de protocolo nº. 0359/12(Apêndice 2).

4.2. Amostra

Para o desenvolvimento deste estudo foram utilizados 36 ratos Wistar-EPM (*Rattus norvegicus*) com oito semanas, machos, com peso aproximado de 260g a 320g, oriundos do Biotério Central do Centro de Desenvolvimento de Medicina Experimental (CEDEME) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

Os procedimentos cirúrgicos experimentais foram realizados no laboratório de Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia da UNIFESP (Prof.^a Titular Lydia Masako Ferreira). Os animais foram confinados no biotério desse laboratório, 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°C, manutenção do grau de umidade e um ciclo claro-escuro de 12 horas. Os animais tiveram o período de sete dias para ambientação, antes da manipulação experimental. Neste estudo os animais foram tratados segundo os princípios éticos da experimentação animal e normas do COBEA.

4.3. Delineamento Experimental

Os animais foram pesados e distribuídos em 3 grupos de 12 animais, com aleatorização pelo site www.randomization.com, conforme figura 1. Todos os animais foram submetidos à realização do retalho cutâneo randômico.

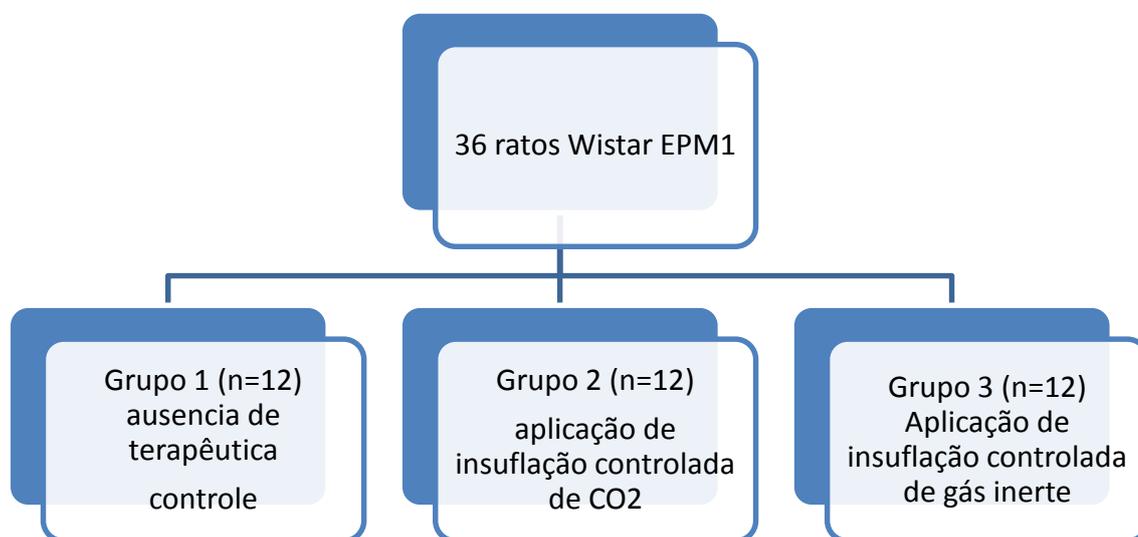


Figura 1: Organograma- Distribuição dos animais nos grupos.

Grupo 1 (Controle): Foi realizado o procedimento de retalho cutâneo randômico porém nenhuma terapêutica foi aplicada, apenas a punctura da agulha.

Grupo 2 (CO2): Foi realizado o procedimento de retalho cutâneo randômico e aplicação da insuflação controlada de CO2, durante 7 dias consecutivos, com fluxo de 150ml/min, punctura de 2 pontos, um distando 2,5cm da base cranial do retalho e outro distando 7,5cm, na parte central mediana do retalho, o tempo de punctura de 5 segundos.

Grupo 3 (gás inerte): Aplicação do gás inerte (gás hélio). Durante 7 dias consecutivos. Com fluxo de 150ml/min, nos mesmos pontos do grupo 2.

4.4. Técnica operatória

Para a realização do retalho cutâneo randômico, os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal, de cloridrato de ketamina (100mg/kg) associado a cloridrato de xilazina (50mg/kg). Para aplicação dos mesmos, foi utilizada seringa de 1ml e agulha hipodérmica de 4,5x13mm.

Após a anestesia os animais foram posicionados em decúbito ventral, imobilizados com fitas adesivas em prancha cirúrgica para realização da epilação digital da região dorsal. Um gabarito de plástico com medidas de 12x6cm foi utilizado para demarcar a área a ser epilada.

Com uma caneta dermográfica da marca piloto de ponta fina, foi demarcada uma área de 12cm de comprimento craniocaudal e 6cm de largura, adotando como limite cranial a margem superior das escápulas e, como limite caudal, 1cm abaixo das cristas ilíacas (Figura 2).



Figura 2: Marcação com caneta da área a ser epilada.

Posteriormente foi realizado o procedimento de epilação digital na área demarcada (Figura 3).



Figura 3: Rato Wistar-EPM submetido á epilação digital na região dorsal do rato

Após a epilação digital, o retalho cutâneo randômico dorsal, de base cranial, foi demarcado através de um gabarito de plástico com as medidas padrão de dez centímetros de comprimento no sentido craniocaudal e 4centímetros de largura no sentido látero-lateral.

O retalho teve como limites os ângulos inferiores das escápulas e os ossos superiores da cintura pélvica conforme ilustrado abaixo: (McFARLANE, DEYOUNG, HENRY, 1965).

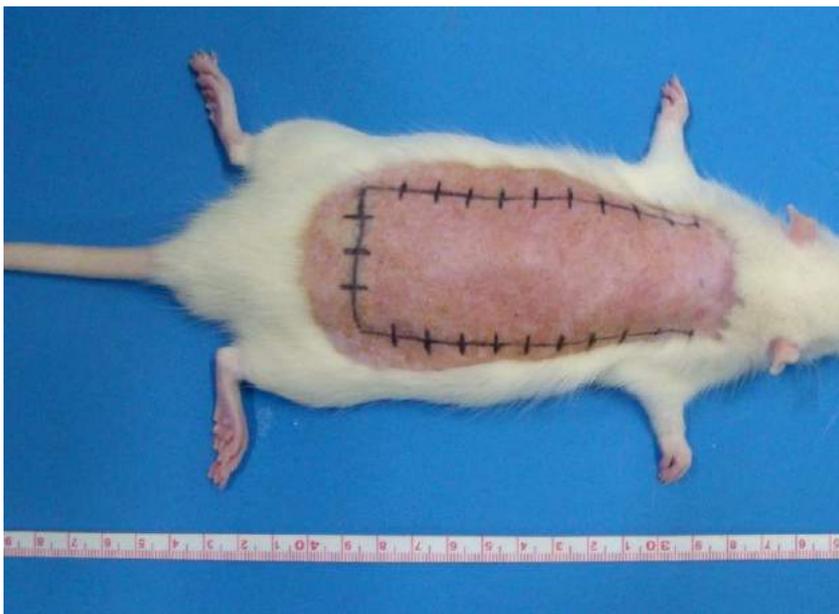


Figura 4: Marcação da área de realização do retalho cutâneo na região dorsal do rato.

A pele foi incisada em todo o perímetro do retalho com auxílio de lâmina de bisturi número 11 (Figura 5). Todos os animais foram operados pela pesquisadora principal.



Figura 5: Retalho cutâneo incisado no dorso do rato.

O retalho cutâneo elevado contendo pele e panículo carnosos(Figura 6).



Figura 6: Descolamento do retalhocutâneo contendo pele e panículo carnososo.

Uma barreira plástica (poliéster/polietileno) com as mesmas dimensões 10x4cm foi interposta entre o retalho e o leito doador, impedindo a revascularização do retalho por meio dos vasos do leito (Figuras 7 e 8).



Figura 7: Vista superior após a colocação da barreira plástica medindo 10x4cm sobre o leito da área doadora do retalho cutâneo.



Figura 8: Vista lateral após a colocação da barreira plástica medindo 10x4cm sobre o leito da área doadora do retalho cutâneo.

Posteriormente o retalho cutâneo foi suturado com 24 pontos simples de fio de náilon monofilamentar 5-0 em sua posição original (“área doadora”), separados 1cm entre si (KORLOF & UGLAND, 1966 (Figura 9).

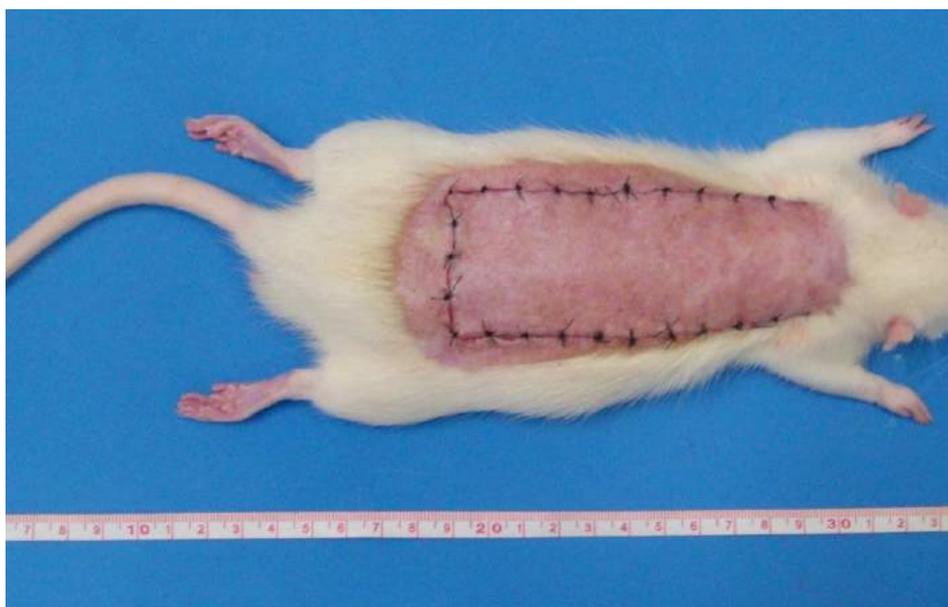


Figura 9- Retalho cutâneo randômico dorsal suturado.

Após o término do ato operatório e, diariamente, até o dia da eutanásia, foi realizada analgesia, com 5mg/kg de Cloridrato de Tramadol, por gavagem.

4.5. Equipamento

Foi utilizado o aparelho Ares da marca IBRAMED®(figura10) com registro na ANVISA sob número10360310032, calibrado previamente ao início do estudo.



Figura 10: Equipamento utilizado para aplicação da técnica nos animais

Os cilindros contendo dióxido de carbono ou gás inerte foram adquiridos da empresa Oxigênio São Paulo. A empresa possui todas as certificações necessárias para envasamento dos cilindros. A pesquisadora não teve conhecimento prévio sobre o conteúdo interno de cada cilindro.

Os rótulos dos cilindros estavam cobertos e pela numeração o fornecedor da empresa possuía conhecimento o conteúdo de cada cilindro que foi revelado após o término do experimento (coleta de dados).

O condutor do gás foi um equipo com filtro apropriado que garantiu a máxima esterilidade do gás, conectado a agulha 30 G 4mm– Agulha 4mm x 0,3 (Agulha bem fina e curta com bisel tri facetado de canhão roxo) da marca Mesoran®.

Na agulha foi demarcado um ponto a 0,2cm de distância da ponta da agulha (figura 11A). Posteriormente foi colocada uma atadura (figura 11B) cobrindo todo o restante da agulha, evitando dessa forma que a agulha penetre além do desejado. Isso foi determinado através do projeto piloto realizado.

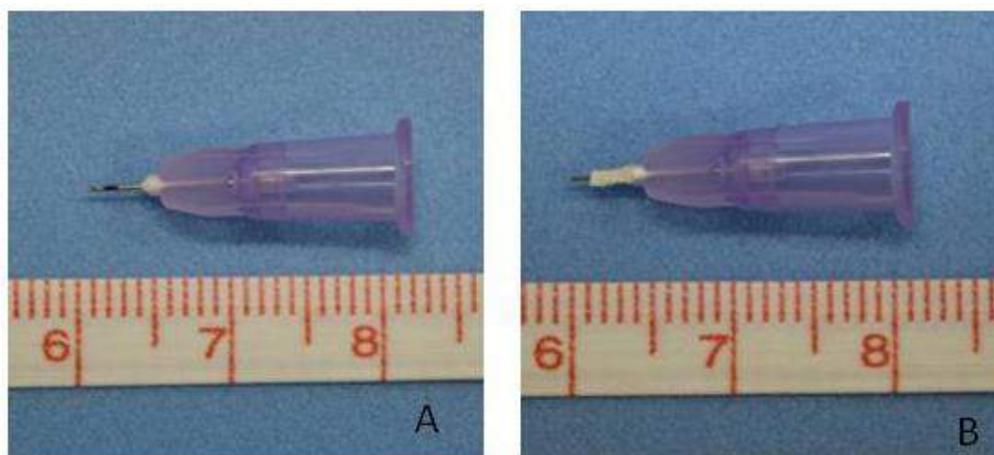


Figura 11 A e B: Delimitação da área de penetração da agulha.

A: Marcação na agulha a 0,2cm.

B: Bloqueio do restante da agulha realizado com fita impermeável branca.

4.6. Procedimento de Aplicação

De acordo com o delineamento experimental os animais foram submetidos à insuflação de dióxido de carbono ou gás inerte administrados via subcutânea seguindo os grupos conforme randomização, após 1 minuto do término do procedimento cirúrgico e por 7 dias consecutivos.

Os animais do Grupo 1 (controle) não receberam nenhuma terapêutica.

Os animais do Grupo 2 foram submetidos à aplicação da insuflação controlada de dióxido de carbono contido no cilindro número 1, com fluxo de 150ml/min sob os pontos demarcados.

Os animais do Grupo 3 foram submetidos à aplicação de gás inerte controlado contido no cilindro número 2, com fluxo de 150ml/min sob os pontos demarcados.

Foi utilizado em todos os animais um gabarito plástico com medidas de 10x4cm, com a demarcação dos pontos de aplicação do gás sendo o ponto A distando 2,5cm da base cranial do retalho e o ponto B distando 7,5cm da base cranial do retalho ao nível do plano sagital mediano (Figura 12).

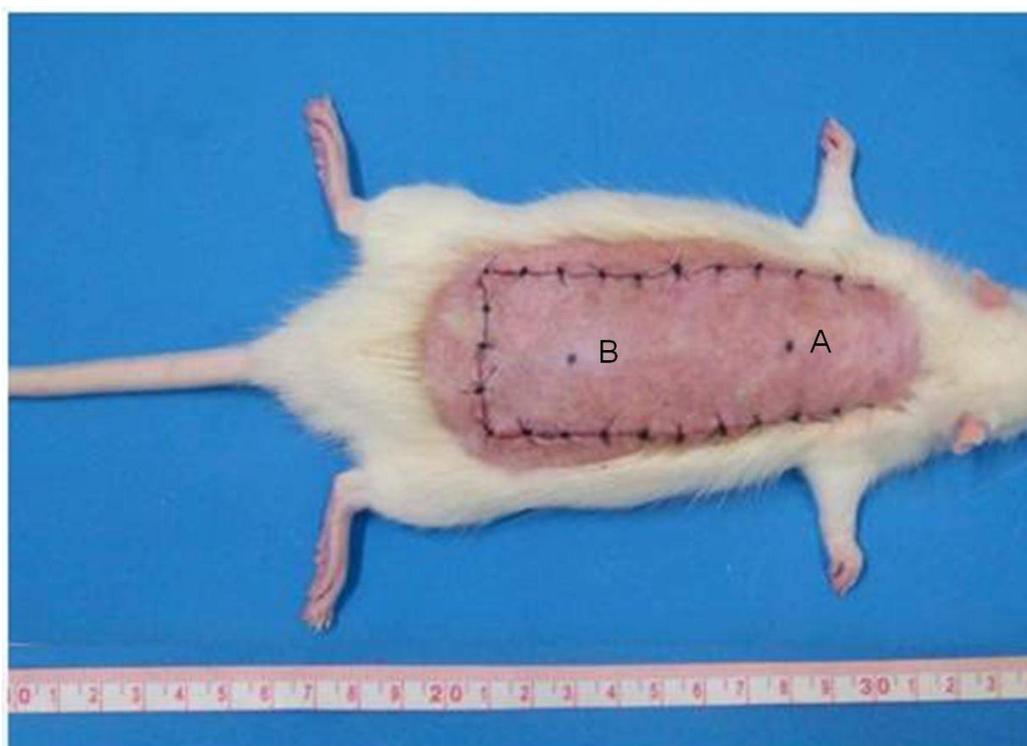


Figura12: Pontos de aplicação do gás demarcados distando 2,5cm e 7,5cm respectivamente da base cranial do retalho cutâneo dorsal.

A agulha foi aplicada a 90 graus em relação ao tecido, com penetração da agulha até a região delimitada pela atadura (figura 13).

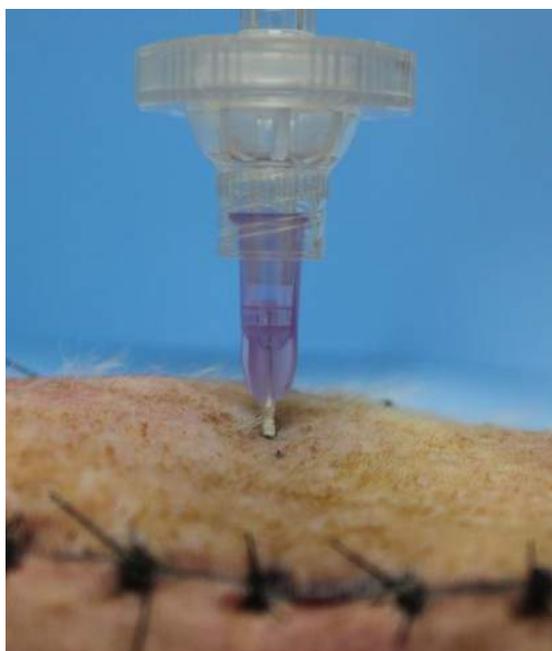


Figura 13: Detalhe da limitação da penetração da agulha de 0,2cm com angulação de 90 graus.

O tempo de punctura foi de 5 segundos e o fluxo foi de 150ml/min.

Ao final do 7º dia, foi realizada a eutanásia dos animais por *overdose* de anestésico (250mg/kg de cloridrato de xilazina e 500mg/Kg de cloridrato de ketamina).

Logo após foram submetidos à avaliação da porcentagem da área de necrose por meio do método gabarito de papel (SASAKI & PANG,1980) para quantificar a porcentagem de necrose no retalho cutâneo randômico.

4.7. Análise macroscópica da área necrosada

Para esta avaliação foi utilizado papel vegetal, grafite 2B e *Software* Adobe Photoshop CS/2®.

No final do 7 dia após a eutanásia, os animais foram posicionados em decúbito ventral, para sobrepor um corte de papel vegetal, medindo 8,0cm de largura e 14,0cm de comprimento. Com grafite 2B, toda a área do retalho e o limite entre o tecido viável (pele macia, rósea, quente e com pelos) e o necrosado (pele rígida, escurecida, fria e sem pelos) foram demarcados no papel vegetal (SASAKI & PANG,1980). Esta avaliação foi realizada por uma pesquisadora que não teve conhecimento a qual grupo os animais pertenciam.

Os moldes desenhados em papel vegetal foram digitalizados em scanner, na resolução de 300dpi. Com o *software* Adobe Photoshop foi mensurada, em pixels, a área total do retalho e, em seguida, a área de necrose do retalho também em pixels.

A área foi calculada através da seguinte fórmula e os dados posteriormente tabelados para avaliação

$$\text{Porcentagem da área de necrose do retalho} = \frac{\text{Número de pixels da área de necrose do retalho}}{\text{Número de pixels da área total do retalho}} \times 100$$

4.8. Exérese da Amostra

Foi coletada uma amostra do retalho cutâneo com medidas de 1x12cm da linha mediana do retalho, recoberto por pele proveniente do dorso de todos os animais (Figura 14). As amostras foram coletadas cirurgicamente por um patologista veterinário, cego ao estudo, e armazenadas em formol tamponado a 10%.



Figura 14: Exérese da amostra medindo 1x12cm retirada do dorso do rato na linha mediana do retalho.

O material foi processado histologicamente e corado pela técnica de hematoxilina e eosina. As análises das lâminas foram feitas pelo mesmo patologista veterinário em um microscópio ótico com aumento de 100 a 400 x.

4.9. Análise Estatística

Inicialmente os dados foram analisados descritivamente. Para as variáveis categóricas foram apresentadas frequências absolutas e relativas e para as variáveis numéricas, medidas-resumo (média, quartis, mínimo, máximo e desvio padrão).

As existências de associações entre duas variáveis categóricas foram verificadas utilizando-se o teste de Qui-Quadrado, ou alternativamente em casos de amostras pequenas¹, o teste exato de Fisher. Em se verificando associação, foi utilizado o resíduo ajustado padronizado para identificar as diferenças locais – caselas com valores absolutos acima de 1,96 indicam evidências de associações (locais) entre as categorias relativas a essas caselas.

A comparação de médias entre os três grupos foram realizadas utilizando-se a Análise de Variância - ANOVA. A ANOVA apresenta como um dos pressupostos a normalidade nos dados, o qual foi verificado empregando-se o teste de Kolmogorov-Smirnov. Para todos os testes estatísticos foi utilizado um nível de significância de 5%.

O software estatístico utilizado para a análise foi o SPSS 20.0

¹ Mais de 20% das caselas de uma tabela de contingência com valores esperados inferiores a 5 casos.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

Tabela 1 – Distribuição dos ratos por camadas atingidas, segundo grupo.

	Grupos						Total		p
	Controle		Aplicação de CO2		Aplicação de gás inerte		N=36		
	N	%	N	%	N	%	N	%	
Camadas atingidas	12	100,00%	12	100,00%	12	100,00%	36	100,00%	0,045
Ausente	4	33,30%	3	25,00%	4	33,30%	11	30,60%	
Somente Derme	0	0,00%	1	8,30%	0	0,00%	1	2,80%	
Somente Hipoderme	0	0,00%	0	0,00%	3	25,00%	3	8,30%	
Hipoderme e Musculatura	5	41,70%	3	25,00%	0	0,00%	8	22,20%	
Derme, Hipoderme e Musculatura	0	0,00%	2	16,70%	3	25,00%	5	13,90%	
Epiderme, Derme e Hipoderme	2	16,70%	0	0,00%	0	0,00%	2	5,60%	
Todas as camadas	1	8,30%	3	25,00%	2	16,70%	6	16,70%	
Tipo de camada atingida¹									
Epiderme	3	25,00%	3	25,00%	2	16,70%	8	22,20%	1
Derme	3	25,00%	6	50,00%	5	41,70%	14	38,90%	0,575
Hipoderme	8	66,70%	8	66,70%	8	66,70%	24	66,70%	1
Musculatura	6	50,00%	8	66,70%	5	41,70%	19	52,80%	0,458 ^a

p- Nível descritivo do teste exato de Fisher ou de Qui-Quadrado (^a)

¹ Resposta múltipla - a soma das porcentagens não totaliza 100,0%. Casos por grupo - N=12.

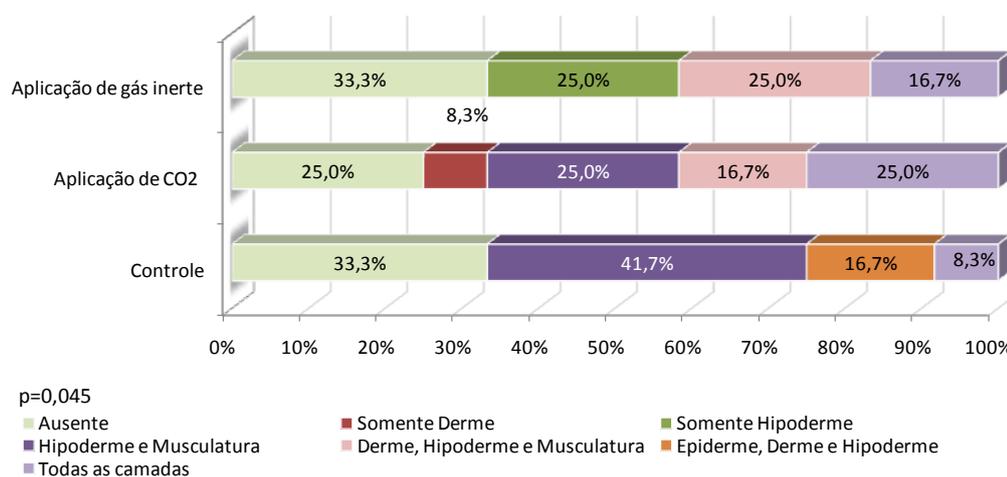


Gráfico 1 – Distribuição dos ratos por camadas atingidas, segundo grupos.

De acordo com a tabela 1 e gráfico 1, verificou-se associação entre grupo e camadas atingidas ($p=0,045$). Dessa forma, nota-se que o grupo

controle apresentou maior porcentagem de alcance da Hipoderme + Musculatura (41,7%) e Epiderme + Derme + Hipoderme (16,7%) comparativamente aos demais grupos. Já o grupo com gás inerte, apresentou maior porcentagem de alcance somente da hipoderme (25,0%) comparativamente aos demais grupos. Entretanto, quando se avalia os alcances por camada, não se verificaram diferenças das porcentagens entre os grupos. Assim, de uma forma geral, 66,7%, 52,8%, 38,9% e 22,2% dos casos tiveram alcance, respectivamente, na hipoderme, musculatura, derme e epiderme.

Tabela 2 – Distribuição dos ratos por infiltrado inflamatório, vascularização, ulceração, segundo grupo.

	Grupos						Total		p
	Controle		Aplicação de CO2		Aplicação de gás inerte		N	%	
	N	%	N	%	N	%			
Infiltrado inflamatório	12	100,00%	12	100,00%	12	100,00%	36	100,00%	1
Ausente	4	33,30%	3	25,00%	4	33,30%	11	30,60%	
Presente	8	66,70%	9	75,00%	8	66,70%	25	69,40%	
Infiltrado inflamatório - Quantidade¹	8	100,00%	9	100,00%	8	100,00%	25	100,00%	0,766
Discreta	1	12,50%	3	33,30%	1	12,50%	5	20,00%	
Moderada	1	12,50%	2	22,20%	2	25,00%	5	20,00%	
Intensa	6	75,00%	4	44,40%	5	62,50%	15	60,00%	
Vascularização	12	100,00%	12	100,00%	12	100,00%	36	100,00%	0,318
Ausente	4	33,30%	1	8,30%	4	33,30%	9	25,00%	
Presente	8	66,70%	11	91,70%	8	66,70%	27	75,00%	
Vascularização- Quantidade²	8	100,00%	11	100,00%	8	100,00%	27	100,00%	0,061
Discreta	1	12,50%	4	36,40%	0	0,00%	5	18,50%	
Moderada	2	25,00%	6	54,50%	4	50,00%	12	44,40%	
Intensa	5	62,50%	1	9,10%	4	50,00%	10	37,00%	
Ulceração	12	100,00%	12	100,00%	12	100,00%	36	100,00%	0,887
Ausente	8	66,70%	9	75,00%	10	83,30%	27	75,00%	
Presente	4	33,30%	3	25,00%	2	16,70%	9	25,00%	

p- Nível descritivo do teste exato de Fisher

¹Somente para casos com Infiltrado inflamatório presente.

²Somente para casos com Vascularização presente.

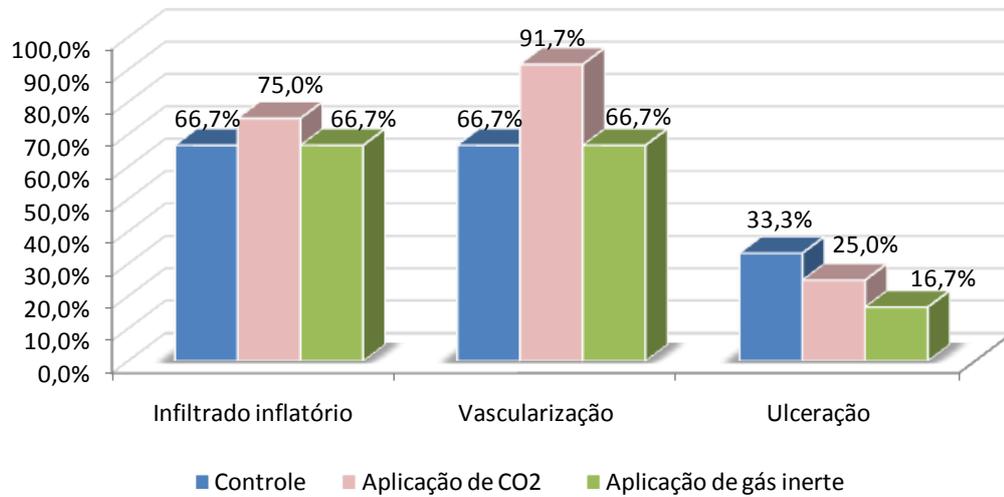


Gráfico 2 – Porcentagem de presença de infiltrado inflamatório, vascularização e ulceração por grupos

Conforme tabela 2 e gráfico 2, não se verificaram distribuições distintas de infiltrado inflamatório - status ($p=1,000$) e quantidade ($p=0,766$), vascularização -status ($p=0,318$) e quantidade ($p=0,061$) e ulceração ($p=0,887$). Entretanto, nota-se que a quantidade de vascularização apresentou-se marginalmente significativa ($p=0,061$).

Tabela 3 – Medidas-resumo da porcentagem de área necrosada por grupo.

Grupos	Média	Desvio Padrão (DP)	Mínimo	Máximo	1° Quartil	Mediana	3° Quartil	N	p
Total	13,3	10,3	0	38,5	6,4	10,8	19,9	36	0,75
Controle	12,2	11,4	0	38,5	2,1	9,7	19,6	12	
Aplicação de CO2	15,2	12,4	0	35,7	3,8	10,8	27	12	
Aplicação de gás inerte	12,6	6,9	3,4	25,6	7,8	10,4	18,7	12	

Teste de Kolmogorov-Smirnov para normalidade ($p=0,329$).

p - Nível descritivo da ANOVA

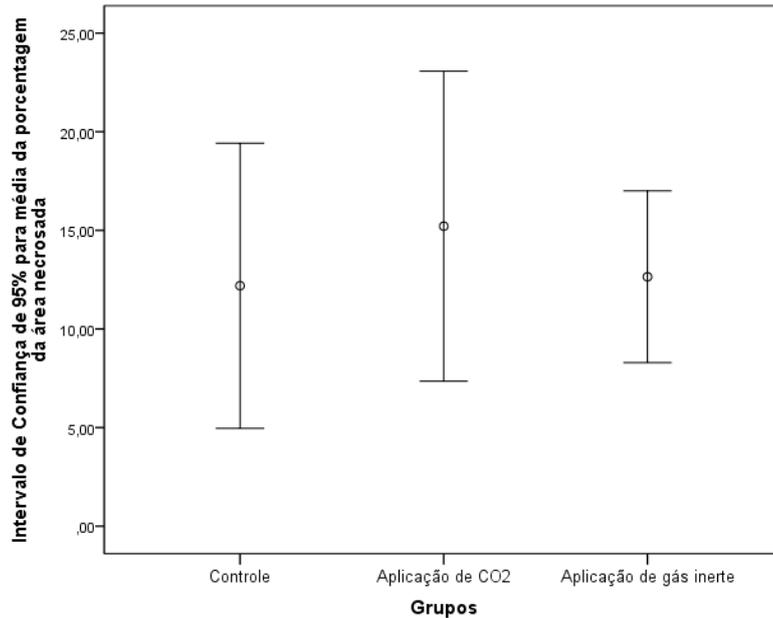


Gráfico 3- Intervalo de Confiança de 95% para média da porcentagem de área necrosada por grupo.

Conforme tabela 3 e gráfico 3, não se verificaram diferenças de médias das porcentagens de área necrosada entre os grupos ($p=0,750$).

Na figura 15 observa-se uma fotomicrografia de uma amostra corada com Hematoxilina e Eosinamostrando o infiltrado inflamatório na seta branca e nos círculos brancos os vasos presentes.

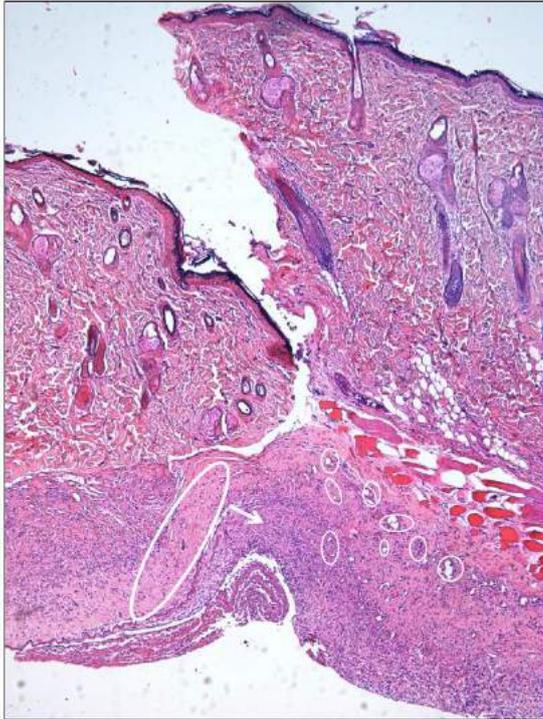


Fig. 15: Fotomicrografia da amostra corada em HE (10 x) da lesão cutânea no rato.

Na figura 16 observa-se a análise histológica de animal do grupo 2 com um intenso infiltrado inflamatório transanexial na elipse branca e neoangiogênese nas setas brancas.

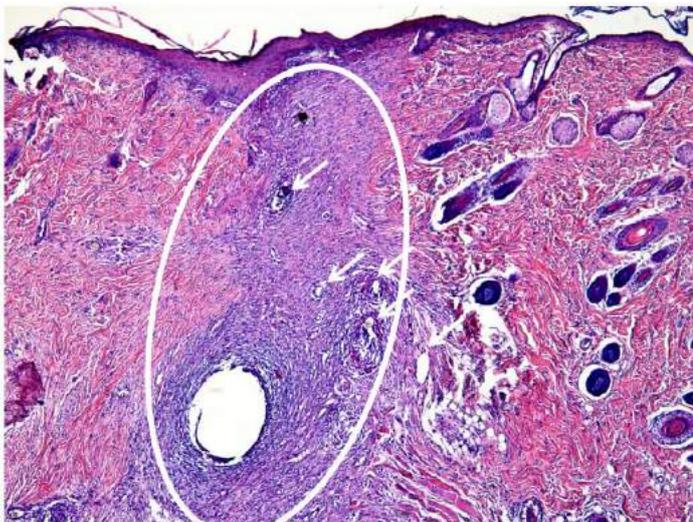


Fig. 16. Fotomicrografia da amostra corada em HE (10 x) da lesão cutânea no rato.

Por fim observa-se na figura 17 a ulceração intensa presente no círculo destacado em preto e o intenso processo inflamatório presente no quadrado branco.

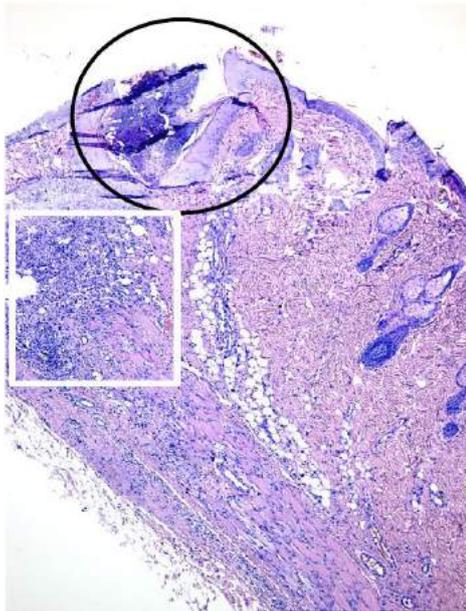


Fig. 17. Fotomicrografia da amostra corada em HE (10 x) da lesão cutânea no rato.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

O retalho cutâneo representa um procedimento frequente na cirurgia plástica e de extrema importância. Infelizmente a necrose e a isquemia são itens que podem interferir de forma negativa nesses procedimentos (HARASHIMA, SAWADA, WATANABE, 1977; KERRIGAN, 1983; FERREIRA *et al.*, 1986).

A busca por recursos que amenizem esses efeitos é frequente e tem sido objeto de pesquisa nos últimos anos com objetivo de aumentar a viabilidade desse retalho. (DUARTE, GOMES, FERREIRA, 1998; HARDER *et al.*, 2004; ABLA *et al.*, 2005; NISHIOKA, 2012).

Neste estudo utilizou-se um modelo de retalho proposto por MCFARLANE, DE YOUNG, HENRY (1965), que se trata de um modelo dorsal de base cranial com medidas de 10cm de comprimento e 4cm de largura.

Optou-se pelo modelo experimental em ratos pela facilidade de aquisição e manejo dos animais, e devido ao fato da maioria dos estudos envolvendo retalhos cutâneos serem realizados com esse tipo de animal o que facilita comparações de ordem anatômica e fisiológica, além disso, esse modelo facilita a busca por resultados em nível cutâneo.

Sabe-se que um dos motivos de necrose é a técnica operatória ao realizar o retalho por isso a pesquisadora passou por um período de curva de aprendizado com objetivo de aprimorar a técnica operatória diminuindo o viés, e esse aprendizado foi de extrema valia.

O retalho cutâneo randômico é o mais frequentemente utilizado nos estudos sobre retalhos, mas para se obter condições homogêneas de isquemia e necrose, foi interposta uma barreira plástica entre o retalho e seu leito, a fim de impedir a revascularização através dos vasos do mesmo, conforme descrito por KORLOF & UGLAND (1966) e utilizado em outros estudos (DUARTE, GOMES, FERREIRA, 1998; LIEBANO, FERREIRA, SABINO, 2002; PINFILDI *et al.*, 2005; PRADO *et al.*, 2009; CURY *et al.*, 2009; BOSSINI *et al.*, 2009; COSTA *et al.*, 2011; NISHIOKA, 2012).

A carboxiterapia é um recurso amplamente utilizado na prática clínica, especialmente na área da estética, porém ainda sua eficácia é contestada. FERREIRA *et al.* (2012) demonstraram em seu estudo a grande dificuldade em encontrar estudos metodologicamente adequados em relação ao uso da insuflação controlada de dióxido de carbono na área da dermatologia e cirurgia plástica. Avaliaram quinze ensaios controlados com alocação aleatória e nenhum deles possuía rigor científico com critérios de inclusão, não inclusão e exclusão e uniformidade de amostra e afirmaram que as

conclusões não possibilitavam credibilidade nos resultados necessitando mais estudos que possibilitassem resultados e conclusão fidedignos.

Este estudo buscou a utilização da carboxiterapia na viabilidade do retalho cutâneo já que segundo alguns autores a técnica sugeria aumento significativo na pressão parcial do oxigênio, proliferação de pequenos vasos sanguíneos neoformados, alterações no calibre vascular, que conduzem ao aumento do fluxo sanguíneo, alterações estruturais na microcirculação, o que seriam de importância para o aumento da viabilidade do retalho. (SAVIN *et al* 1995, BRANDI *et al*, 2004, WOLLINA *et al* (2004), BRANDI *et al*, 2010).

A literatura não possui um padrão em relação à utilização da insuflação controlada de dióxido de carbono em ratos. FERREIRA, HADDAD, TAVARES (2008) sugeriram que fossem realizadas pesquisas que abordem a profundidade da aplicação, volume de gás bem como o intervalo entre as sessões. Baseado nessa ausência de padronização realizou-se o estudo piloto, para determinar os parâmetros adequados para a aplicação da técnica.

Primeiramente definiu-se qual agulha e que angulação a mesma deveria ser utilizada. SOMEZ *et al.* (2009) realizaram um estudo no qual fazem uso de insuflação controlada de dióxido de carbono, porém não relatam qual tamanho de agulha, nem qual angulação a mesma foi utilizada, PENHAVEL *et al.* (2013) realizaram um estudo randomizado com ratos wistar porém

também não citam os parâmetros utilizados nas aplicações. Já RAYMUNDO *et al.* (2014) relatam ter inserido toda agulha no animal para injetar o gás em tecido hipodérmico, porém ao realizar o estudo piloto quando a agulha deste tamanho é inserida a 90° em relação ao tecido a mesma atravessa toda a pele, a hipoderme do animal, porções musculares atingindo as vísceras. Optou-se, portanto por fazer uso da agulha de mesmo tamanho, porém limitando a introdução da mesma em 0,2mm espessura da pele do animal para que a mesma pudesse depositar o gás na camada a ser investigada.

Quanto à inclinação da agulha, sabe-se que é importante para determinar o tecido alvo e profundidade de penetração do gás. Em relação ao retalho, buscou-se a distribuição igualitária do gás em todo retalho. Determinou-se pelo estudo piloto que angulações menores que 90° não provocaram deslocamento de gás adequado, levando apenas o deslocamento unilateral do gás. Optou-se, portanto a aplicação em dois pontos e em 90° em relação à pele do animal, buscando a distensão completa do retalho.

Em relação aos parâmetros de fluxo e o tempo de punctura, diversos foram os valores utilizados nos estudos com animais, variando de 10 a 20 ml/ minuto (LYRA *et al.*, 2012; FERREIRA, HADDAD E TAVARES 2008), 30-50 ml/minuto (VALARO *et al.*, 2007) e 80 ml/minuto durante 10

segundos (RAYMUNDO *et al.*, 2014), além dos estudos que não citam os parâmetros utilizados como de PENHAVEL *et al.* (2013).

VALARO *et al.* (2007) relataram que o limite diário de injeção de CO₂ é de 2000 ml por sessão de carboxiterapia em humanos, e normalmente o fluxo médio utilizado para a injeção de CO₂ é de 30-150 ml/minuto e em animais segundo FERREIRA, HADDAD E TAVARES (2008), a velocidade do fluxo de 20 ml/min, porém salientam a necessidade de estabelecer e padronizar o fluxo e a pressão.

No presente estudo essa quantidade descrita por esses autores não foi adequada, pois o tempo de aplicação de 10 segundos foi longo, causando uma distensão excessiva num único ponto porém não provocando a distensão ao longo de todo o retalho. No estudo piloto, adequamos esses parâmetros tempo e fluxo ao objetivo do estudo, sendo para o descolamento total do tecido e completa distribuição do gás no retalho, proposto um fluxo de 150ml/min por 5 segundos em cada um dos dois pontos determinados.

Em humanos também não há padronizações em relação à nenhum dos aspectos seja ele o tamanho da agulha, a angulação de inserção da mesma, velocidade de insuflação do gás e volume total injetado por sessão, tampouco para o intervalo entre as sessões e número de sessões recomendadas para as alterações propostas. Baseado nessa ausência de padronização e de

resultados, dois estudos de revisão sistemática foram realizados para verificar a eficácia da técnica FERREIRA *et al* (2012) e BROCKOW *et al* (2000) e ambos relataram que não há evidências científicas da eficácia da mesma, devido ao precário rigor científico das avaliações e não adequação metodológica dos estudos.

Em relação as camadas afetadas, no grupo controle houve comprometimento de todas as camadas, apesar da ausência de terapêutica houve um comprometimento de camadas além da epiderme local onde foi inserido a agulha, o que pode ser explicado pela presença do processo inflamatório. Esse processo pode ser dado em função da barreira plástica interposta para impedir a vascularização também citado por NISHIOKA (2012) e por PENHAVEL *et al* (2013).

Já o grupo com gás inerte, apresentou maior porcentagem de alcance somente da hipoderme (25,0%) comparativamente aos demais grupos, provavelmente isso se deva ao fato do gás demorar mais para ser absorvido (gás mais leve que o ar) que o gás carbônico e dessa forma causar um aumento do processo inflamatório e uma lesão mais profunda que os demais, já que quimicamente esses gases não possuem ação nos tecidos.

Outro fato a ser relatado é que independente do grupo, no geral, 66,7%, 52,8%, 38,9% e 22,2% dos casos tiveram alcance, respectivamente, na

hipoderme, musculatura, derme e epiderme. Isso pode estar relacionado também a barreira plástica interposta e não necessariamente aos gases já que estatisticamente não houve diferença significativa entre os grupos.

Conforme tabela 2 e gráfico 2, não se verificaram distribuições distintas de infiltrado inflamatório - status ($p=1,000$) e quantidade ($p=0,766$), vascularização -status ($p=0,318$) e quantidade ($p=0,061$) e ulceração ($p=0,887$) esse mesmo resultado foi encontrado por LYRA *et al.* (2012) em seu estudo também relataram não ter encontrado diferença significativa entre os grupos controle e tratado com dióxido de carbono e também propõe novos estudos na busca de evidências científicas para a técnica.

Porém, é frequente na literatura resultados contrários aos desse estudo. Em um deles ABRAMO & TEIXEIRA (2010) sugeriram que o dióxido de carbono é responsável pela diminuição do pH, desencadeando respostas inflamatórias de natureza diversa nos tecidos infundidos. No entanto, o “n” de pacientes e a variabilidade de lesões não permitem resultado ou conclusão de confiabilidade, além disso é importante ressaltar que o estudo não cita a aprovação pelo comitê de ética em pesquisa. COSTA *et al.* (2011) em seu estudo relatam que seus resultados positivos se devem em relação ao aumento da vascularização e aumento do processo inflamatório no tecido

após infusão com dióxido de carbono. No entanto, o rigor científico para avaliação dos resultados foi precário e sem adequação metodológica.

Apesar de não haver significância estatística entre os grupos, nota-se que a quantidade de vascularização apresentou-se marginalmente significativa ($p=0,061$). Esse fato também é citado por diversos autores e também utilizado com justificativa para a intensa prática clínica de alterações estéticas que curse com baixa vascularização como a hidrolipodistrofia ginóide.(ABRAMO & TEIXEIRA, 2010; SCORZA & BORGES, 2008; WOLLINA *et al.*, 2004; BRANDI *et al.*,2001; SAVIN *et al.*, 1995)

No presente estudo em relação à % de área necrosada os testes estatísticos mostraram que não existe diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Dessa forma, não há justificativa na aplicação da insuflação controlada de CO₂ para diminuir a porcentagem de necrose em retalho cutâneo randômico.

Apesar da ampla literatura sobre o uso da técnica nota-se que não há uniformização de critérios de inclusão, não inclusão e exclusão dos pacientes, às aplicações da técnica, padronizações no número e intervalo entre as sessões, o mesmo ocorre na literatura com estudos feitos em animais. Ademais, o rigor científico para a avaliação dos procedimentos foi precária maioria dos estudos e sem a adequação metodológica.

Merece destaque nas perspectivas o uso mais criterioso, da técnica conhecida popularmente como Carboxiterapia, uso clínico do dióxido de carbono injetável.

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 porém sem comprovação científica. No entanto, os estudos existentes apresentam número amostral reduzido, metodologia inadequada e os resultados são avaliados em curto prazo.

Recomenda-se que mais estudos de qualidade metodológica sejam realizados, com um "n" maior, com outros tipos de análises histológicas como a imunohistoquímica, com parâmetros diversos, especialmente no âmbito das ações fisiológicas da técnica para que possa ser considerada eficaz ao que se propõe.

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

Conclui-se com este estudo que a insuflação controlada de dióxido de carbono não altera a viabilidade de retalho cutâneo randômico em ratos.

REFERENCIAS

8. REFERENCIAS

Abla LE, Gomes HC, Percario S, Ferreira LM. Acetylcysteine in random skin flap in rats. *Acta Cir Bras* 2005;20(2):121-3.

Abramo AC, Teixeira TT, Ledo-Silva MC, Oliveira EL de. Elevação da temperatura cutânea após a infusão controlada de dióxido de carbono. *Rev Bras Cir Plást* 2009; 24(3):257-61.

Abramo, AC, Teixeira TT. carboinsuflação em úlceras crônicas dos membros inferiores. *Rev Bras Círg Plást* 2011; 26(2);205-10.

Asai S, Fukuta K, Torii S, Tropical administration of prostaglandin E1 with iontophoresis for skin flap viability. *Ann Plast Surg* 1997; 38: 514-7.

Balik O, Yilmaz M, Bagriyanik KA, Does Carbon Dioxide Therapy Really diminish localizade adiposities? Experimental study with rats. *AesthPlast Surg* 2011. Aug; 35(14):470-4

Barthe GP, Suarez NC, Ortega JMR. Morphological changes in the vascularisation of delayed flaps in rabbits. *Br J Plast Surg* 1991;4(4):285-90.

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.

Branco CR, Oliveira PR de, Esteves, JR L., Liebano, RE, Bandan C, Gomes, AC. Corrente direta na viabilidade de retalho cutâneorandômico em ratos. *Rev Inst Cienc Saude* 2005 jan-mar;23(1)11-7.

Brandi C, D'aniello C, Grimaldi L, Caiazo E, Sthanghellini E, Carbon Dioxide Therapy: Effects on Skin Irregularity and Its Use as a Complement to Liposuction, *Aesth Plast Surg*, 2004, 28:222-5

Brandi C MD, D'aniello C MD, Grimaldi L MD, Bosi B MD, Dei i MD, Lattarulo P MD, Alessandrini C MD. Carbon Dioxide Therapy in the Treatment of Localized Adiposities: Clinical Study and Histopathological Correlations, *Aesth Plast Surg*, 2001,25:170- 4.

Brandi C, Grimaldi L, Nisi G, Brafa A, Campa A, Calambro 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

Brockow, T.; hausner, T.; Dillner, A.; Resch KL. Clinical Evidence of subcutaneous Co2 Insufflations. *J Altern Complement Med* 2000; 6(5):391-403

Costa, CS; Otoch JP, Seelander MCL, Neves, RX das, Martinez, CAR, Margarido NF. Avaliação citométrica dos adipócitos localizados no subcutâneo da parede anterior do abdome após infiltração percutânea de CO2. *Rev Col Bras Cir* 2011; 38(1):015-023

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):27-32
Cymrot M, Percário S, Ferreira LM Comportamento do estresse oxidativo e da capacidade antioxidante total em ratos submetidos a retalhos cutâneos isquêmicos. *Acta Cirúrgica Brasileira* - 19 (1) 2004; 19-26

Duarte IS, Gomes HFC, Ferreira LM. Effect of dimethyl sulphoxide on necrosis of skin flaps in rats. *Can J Plast Surg* 1998;6(2):93-7.

Esteves Junior I, Masson IB, Ferreira LM, Liebano RE, Baldan C, Gomes AC. Administração tópica de cloridrato de hidralazina na viabilidade de retalho cutâneo randômico em ratos. *Acta Cir Bras* [serial online] 2005 Mar-Abr; 20(2). Disponível em URL: <http://www.scielo.br/acb>

Ferreira JC, Haddad A, Tavares SA. Increase in collagen turnover induced by intradermal injection of carbon dioxide in rats. *J Drugs Dermatol* 2008, 7(3): 201–6.

Ferreira, L M ; Silva, E K ; Jaimovich, C A ; Calazans, D ; Silva, E R ; Furtado, FA ; Cosac, O ; Nader, P ; Corrêa, W E M Y . Carboxiterapia: buscando evidência para aplicação em cirurgia plástica e dermatologia. *Rev Bras Cir Plast*, 27, 2012. 350-1.

Ferreira LM, Andrews JM, Laredo Filho J, Ramos RR. Retalho fásio-cutâneo axial na reparação de perdas de substâncias da perna. *F Med* 1986;93(4):261-4.

Ferreira, LM. Retalhos cutâneos. In: Ferreira, LM. *Manual de Cirurgia plastica*. São Paulo: Ed. Atheneu. 1995: 45-62.

Ferreira LM; Andrews JM, Laredo Filho J. Retalho fasciocutâneo de base distal: estudo anatômico e aplicação clínica nas lesões do terço inferior da perna e tornozelo. *Rev Bras Ortop* 1987;22(5):127-31.

Ferreira LM, Andrews JM, Filho JL. Homologus transplantation of a limb (compound tissue): perspective for the future. *Rev Assoc Med Bras* 1995;41(2):151-7.

Freitas, AD, Pardini Junior AG. Retalhos antebraquiais pediculados para cobertura dos defeitos cutâneos da mão. *Rev Bras Ortop* 1993;28: 204-8.

Harashima T, Sawada Y, Watanabe S. The relationship between venous occlusion time in island flaps and flap survivals. *Plast Reconst Surg.* 1977;60(1):92-95

Harder Y, Amon M, Erni D, Menger MD. Evolution of Ischemic Tissue Injury in a Random Pattern Flap: A New Mouse Model Using Intravital Microscopy. *J Surg Res.* 2004;121(2):197–205.

Jansen G, Lundeberg T, Samuelson UE, Thomas M. Increased survival of ischaemic musculocutaneous flaps in rats after acupuncture. *Acta Physiol Scand.* 1989;135(4):555-8.

Kaufman T, Angel MF, Eichenlaub EH, Levin M, Hurwitz DJ, Futrell JW. Os efeitos salutareos da cama na sobrevivência de retalhos experimentais. *Ann Plast Surg* 1985; 14: 64-73

Kerrigan CL. Skin Flap Failure: Pathophysiology. *Plast Reconstr Surg* 1983; 72(6): 766-77.

Krag C, Taudorf U, Siim E, Bolund S. The effect of pulsed electromagnetic energy (Diapulse) on the survival of experimental skin flaps. A study on rats. *Scand J Plast Reconstr Sur.* 1979;13(3):377-80

Korlof B, Ugland O. Flaps and flap necrosis. Improving the circulation in skin flaps with Complamin and with Dicoumarol: animal experiments *Acta Chir Scand.* 1966; 131(5): 408-12

Liebano, RE, Ferreira, LM, Sabino, M. Experimental model for transcutaneous electrical nerve stimulation on ischemic random skin flap in rats. *Acta Cir Bras*, 2003, vol.18, no.spe, p.54-59

Lyra MC, Leão Júnior H, Previde Neto S, Orgaes FAFS, Gonella HA. Tratamento de queimaduras de carboxiterapia em modelo experimental. Rev Bras Queim. 2012;11(1):2-5

McFarlane RM, Deyoung G, Henry RA,. The design of a pedicle flap in rat to study necrosis and its prevention. Plast Reconstr Surg 1965; 35:177-82

Nishioka, M A. Pinfild CE, Sheliga, TR, Arias VE, Gemes, HC, Ferreira LM: Led (660nm) and laser (670nm) use on skin flpa viability: angiogenesis and mast cellon transition line. Lasers in Medical Science. September. 2012; v.27. p.1045-50.

Penhavel, MVC, Nascimento VHT, Durães EFR, Carneiro FP, Souza, JB de. Effects of carbon dioxide therapy on the healing of acute skin wounds induced on the back of rats. Acta Cir Bras, São Paulo, v. 28, n. 5, p. 334-339, May 2013

Pinfild CE, Liebano RE, Hochman BS, Ferreira LM. Hellim-neon laser in viability of randon skin flap in rats. Lasers Surg Med. 2005; 37:74-7.

Pinfildi CE, Liebano RE, Hochman BS, Enokihara MM, Lippert R, Gobbato RC, Ferreira LM. Effect of low-level laser therapy on mast cells in viability of the transverse rectus abdominis musculocutaneous flap. Photomed Laser Surg 2009;27(2):337-43.

Prado RP; Ferreira LM, Liebano RE, Hochman B, Pinfildi CE. Diode Laser in viability of random skin flap in rats. Photomed Laser Surg 2005;23(1):89-151.

Prado RP, Liebano RE, Hochman BS, Pinfild CE, Ferreira, LM. Experimental models for low level laser therapy on ischemic random skin flap in rats. *Acta Cir Bras*. 2006;21: 258-62

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.

Raymundo E C, Hochman B, Nishioka M A, Freitas J OG , Maximino J R, Chadi G. Effects of subcutaneous carbon dioxide on calcitonin gene related peptide and substance P secretion in rat skin. *Acta Cir Bras* 2014.Apr; 29(4): 224-30.

Sakai Y, Miwa M, Oi K, Eeha T, Koh A, Kiikura T, Iwa Kura Y, Lee SY, Tanaka M, Kurosaka M, A novel system for transcutaneous applications of carbon dioxide causing an "artificial Bohr Effect" in the human body. *PloS One*. 2011; 6(9): e 24137

Sasaki GH, Pang CY.. Hemodynamics and viability of acute neurovascular island skin flaps in rats. *Plast Reconstr Surg* 1980; 65:152-8

Savin E, Bailliart O, Bonnin P, Bedu M, Cheynel J, Coudert J, Martineaud JP,. Vasomotor effects of transcutaneous CO2 in stage II peripheral occlusive Arterial Disease. *Angiology* 1995;46(9);785-91

Scorza,F.; Borges,F. Carboxiterapia: Uma Revisão *Revista Fisioterapia Ser* . Ano 3, n4 – out/nov/dez – 2008

Siegel,S e Castellan JR, NJ. Estatística não paramétrica para ciências do comportamento. Segunda edição- Artemed-Porto Laegre- 448p.2006.

Sobanski R, Beutill G, Schilling K. Randomisitierte vergleichende studie swischen eir monotherapie mit cos gsbadern und einer monotherapie mit cos gasinsufflationen bei patienten mit artheriellen durchubutungstorungen. z. physiother. 1989; 41:155-9

Somez Ahmet, Yaman M, Yalcin O, Ersoy B. Serin M, Sav, A. Carbon Dioxide Ththerapy increases capillary formation on random pedicle skin flaps in the rat. Journal of Plastic Surgery(2009) 62, 236-7.

Toriyama T.; Kumada Y.; Matsubara T.; Murata A.; Ogino A.; Hayashi,H.; Nakashima H.; Takahashi H.; Matsuo H.; Kawahara H. Efeito do dióxido de carbono em pacientes portadores de arteriopatia periférica com isquemia crítica. Int Angiol. 2002. Dec;21(4):367-73.

Ugland O. Flaps and necrosis. Acta Chir Scand. 1966; 131: 408-12.

Valaro V, Manzo G, Mugnaini F, Bisacci C, Fiorucci P, Rango P, Bisacci R. Carboxitherapy: effects on microcirculation and its use in treatment of severe lymphedema: A review. Acta phelebol 2007;8, 1-13.

Wollina U, Heinig, B, Uhlemann. Transdermal CO2 Application in Chronic Wounds. Case Reports. International Journal of Lower Extremity Wounds 3(2); 2004.103-6

Wetsphal S. Ein Beitrag zur behandlug der migrane mit der subkutanen kolendioxidinsufflation. Berlin Humboldt. 1991.

Zwaan W, Kloess W, Kagel C, Kummer-Kloess D, Matthies-Zwaan S, Schutz RM, Weiss HD, Carbon dioxide as an alternative contrast medium in peripheral angiography Rofo Fortschr Geb Rontgenstr Neuen Bildgeb Verfahr. 1996 Aug; 165(2):180

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 Anatomica Veterinária. 3.ed. New York:Ithaca, 1983. 216p.

-Terminologia Anatômica. Terminologia Anatômica Internacional. São Paulo: Manole; 2001. 248p.

ABSTRACT

ABSTRACT

Introduction: The skin flap is a frequent surgical procedure in reconstructive surgery. Among the techniques that can be used to minimize complications as necrosis, the use of the controlled insufflation of carbon dioxide (i.e. carboxitherapy) is a good option. Carboxitherapy consists the use of the medicinal carbon dioxide (carbon dioxide, anhydrous carbon dioxide or CO₂) injected into the subcutaneous tissue, which stimulates physiological effects such as circulation and tissue oxygenation. **Objective:** To investigate the effect of controlled insufflation of carbon dioxide in the viability of ischemic random skin flap in rats. **Methods:** Thirty-six Wistar-EPM rats were randomized into 3 groups: control group, group 2 where controlled carbon dioxide was injected in the subcutaneous tissue and group 3 where inert gas was inflated. The CO₂ e the inert gas were inflated for 5 second under a 150 ml/min flow, 90° towards the skin with a 0.2 mm piercing needle, in two points of the cranial base, 2,5 cm and 7,5 cm respectively. The procedure was performed during 7 consecutive days. Macroscopic analyzes of the necrotic area e microscopic analyzes of microvascularization with hematoxylin and eosin staining were performed. **Results:** There was no statistically significant difference of the affected layers parameters, vascularization and necrosis. **Conclusion:** No significant results were observed of the use of carbon dioxide in the viability of ischemic random skin flap in rats.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 - PROJETO PILOTO

1. OBJETIVO

Determinar a profundidade de penetração e angulação da agulha para aplicação da técnica de insuflação controlada de dióxido de carbono

2. MÉTODOS

O mesmo descrito na dissertação item 4, porém utilizados 3 animais

2.1 Procedimento de Aplicação

Foi utilizado em todos os animais um gabarito plástico com medidas de 10x4cm, com a demarcação dos pontos de aplicação do gás sendo o ponto A distando 2,5cm da base cranial do retalho e o ponto B distando 7,5cm da base cranial do retalho.

A questão levantada no momento foi qual a inclinação e profundidade de penetração da agulha seriam mais adequadas. Os estudos realizados por FERREIRA, HADDAD & TAVARES (2008) utilizaram agulha 30g 1/2 foram com a agulha penetrando no tecido apenas o bisel, a 45° em relação ao tecido e relatam ser uma profundidade 0,2cm. Realizamos conforme dito no estudo, impessoal uma agulha menor a 30G 4mm, e a penetração feita nos parâmetros mencionados no estudo foi menor que isso 0,1cm, atingindo apenas a epiderme, formando pápula branca.

No mesmo estudo é citado a penetração inteira da agulha a 90° como técnica subdérmica, atingindo a derme, porém realizamos conforme descrito e a agulha atravessa toda a derme chegando em panículo carnosos. É

importante ressaltar que foi utilizada uma agulha menor que a citada no estudo ainda assim ela atravessa o tecido, não sendo portanto o parâmetro ideal para os objetivos deste estudo, vascularização de derme. Utilizamos uma régua e medimos a espessura do tecido e vimos que o mais adequado seria uma penetração de 0,2cm e não 0,4cm como ocorre quando a agulha é inteiramente introduzida.

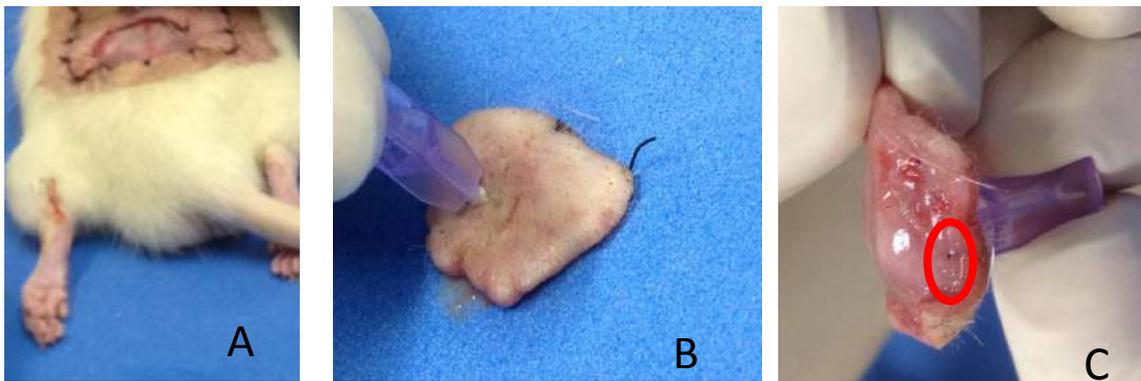


Figura 1 :Demonstração da profundidade de penetração da agulha

- A: Amostra de 2x2cm de tecido do retalho realizado no animal
- B: Penetração da agulha toda a 90° em relação ao tecido
- C: Agulha ultrapassa a derme atingindo panículo carnosos.

Outra dificuldade observada com a aplicação da agulha a 45° é a direção do gás no retalho. Ao introduzir a agulha o gás tem tendência a caminhar na direção em que foi introduzido e as áreas atrás de onde foi feita a punctura ficam sem preenchimento, o que não é adequado ao objetivo do estudo.



Figura 2: Aplicação do gás com agulha a 45° em relação ao tecido

Dessa forma identifica-se que o mais adequado seria uma punctura a 90° em relação ao tecido, porém com uma limitação na profundidade de penetração. Para isso foi demarcado um ponto a 0,2cm de distância da ponta da agulha (figura 3). Posteriormente foi colocada uma atadura cobrindo todo o restante da agulha, evitando dessa forma que a agulha penetre além do desejado.

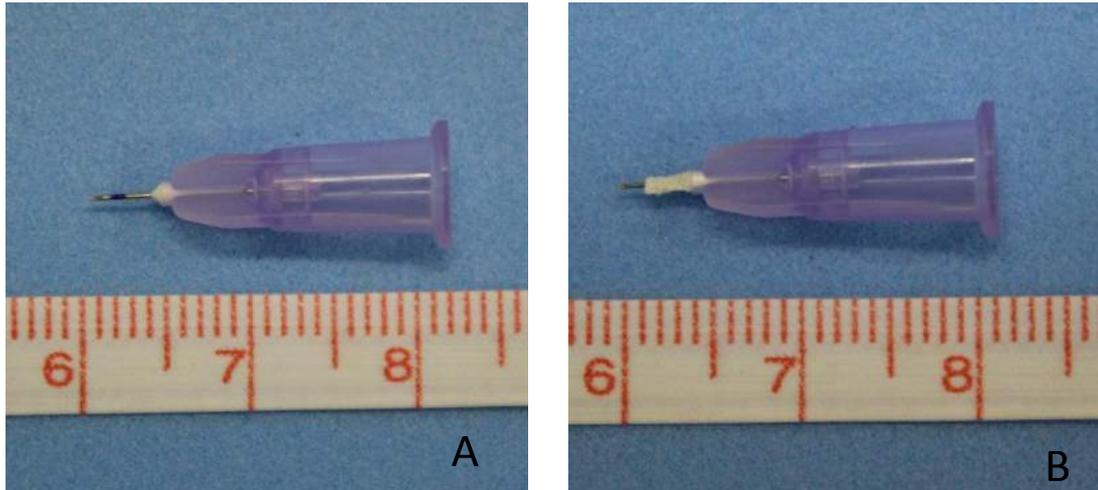


Figura 3: Limitação da penetração da agulha

A: Marcação de 0,2cm para penetração da agulha

B: Colocação de fita adesiva para limitação da penetração da profundidade da penetração da agulha em 0,2cm

A agulha foi aplicada a 90° em relação ao tecido, com penetração da agulha até a região delimitada pela atadura. Dessa forma, o retalho foi todo preenchido com o gás e o mesmo foi aplicado na profundidade necessária para produzir o efeito desejado na derme



Figura 4:Aplicação 90°com limitação de profundidade e distribuição adequada do gás

Num primeiro momento fez-se um ponto central e utilizou-se 5 segundos de punctura num fluxo de 150ml/min porém observou-se que as regiões mais próximas distenderam muito e as mais distantes não distenderam (Figura5).



Figura 5: Aplicação com um ponto central.

Optou-se, por fazer dois pontos de punctura. Um distando 2,5cm da base cranial e outro distando 7,5cm da base cranial no plano sagital mediano do retalhos. Dessa forma, todo retalho foi distendido da forma mais adequada (Figuras 6 e 7).



Figura 6: Aplicação no ponto distando 2,5cm da base cranial
Tempo para preenchimento da região foi de 5 segundos



Figura 7: Aplicação no ponto distando 7,5cm da base cranial do
retalho



Figura 8: Preenchimento da porção distal do retalho

O mais adequado para o objetivo desse estudo foi a realização de dois pontos de punctura de gás, um distando 2,5cm e outro distando 7,5cm da base cranial do retalho, com agulha 30x4mm, com marcação e limitação de profundidade de penetração a 0,2cm e angulação de 90° em relação ao tecido e num fluxo de 150ml/min por 30 segundos.

APENDICE 2- Carta de aprovação do CEP



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

São Paulo, 14 de dezembro de 2012

CEP Nº: **0359/12**

Ilmo(a) Sr(a)

Pesquisador(a): **MARIANA MERIDA CARRILLO NEGRÃO**

Disciplina/Departamento Cirurgia Plástica/Cirurgia

Pesquisadores associados: Bernardo Sergio Hochman Rzeszetkowski, Lydia Masako Ferreira (orientadora)

Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

TÍTULO DO ESTUDO: Insuflação de dióxido de carbono em retalho cutâneo randômico isquêmico em ratos :

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: Experimental, categoria B - estudo agudo

RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: Não se aplica

OBJETIVO DO ESTUDO: Verificar o efeito da insuflação controlada de dióxido de carbono na viabilidade do retalho cutâneo randômico isquêmico em ratos.

RESUMO: Estudo com 36 ratos Wistar EPM-1, machos, adultos. Anestésico: ketamina e xilazina. Analgésico: tramadol. Eutanásia: hiperdosagem de anestésico. Os animais serão pesados e distribuídos randomicamente em três grupos: (G1) grupo controle (realização do retalho cutâneo randômico isquêmico) sem aplicação de insuflação controlada de CO₂; (G2) Aplicação da insuflação controlada de CO₂ no pós-operatório do retalho cutâneo randômico isquêmico; (G3) Aplicação de gás inerte no pós-operatório de retalho cutâneo randômico isquêmico. Os animais serão anestesiados e terão os pelos da região superior do dorso tricotomizado. Em seguida, será realizado um retalho de base cranial com 10 cm de comprimento e 4cm de largura no dorso dos animais. Os animais serão submetidos à insuflação de anidrido carbônico ou ar comprimido administrados via subcutânea. Serão realizados registros fotográficos e a determinação da área necrosada através do método manual conhecido como gabarito de papel descrito. Amostras do tecido serão retiradas a uma distância de 5 cm da base do retalho de todos os animais e posteriormente será realizada a morte assistida indolor por hiperdosagem de anestésico. Serão realizadas análises histológicas e imunohistoquímicas para avaliação de angiogênese.

FUNDAMENTOS E RACIONAL: O retalho de pele é o procedimento cirúrgico mais frequentemente utilizados na cirurgia plástica e uma das maiores preocupações em relação com os mesmos é a isquemia. Estudos que tentam aumentar a sobrevida do retalho por métodos farmacológicos foram relatados. No entanto, os efeitos das drogas são geralmente transitórios e instáveis. A insuflação controlada de dióxido de carbono, carboxiterapia, constitui-se de uma técnica onde se utiliza o gás carbônico medicinal injetado no tecido subcutâneo, estimulando assim efeitos fisiológicos como melhora da circulação e oxigenação tecidual realizaram estudo com insuflação controlada de dióxido de carbono em pré operatório de retalho cutâneo e concluíram que houve aumento capilares na região porém não sob a região do retalho atribuindo a isso o fato de ter um processo inflamatório local. Não foi encontrado nenhum trabalho em pós operatório de retalho cutâneo randômico.

MATERIAL E MÉTODO: Estão descritos os procedimentos do estudo.

TCLE: Não se aplica

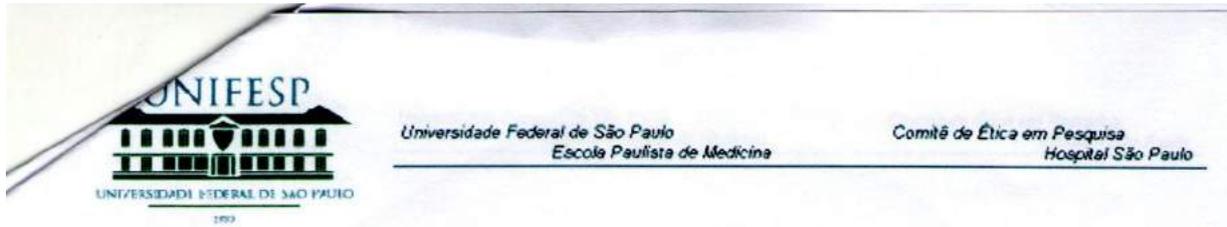
DETALHAMENTO FINANCEIRO: Sem financiamento externo - R\$ 6092,00

CRONOGRAMA DO ESTUDO: 18 meses

PRIMEIROS RELATÓRIOS PARCIAIS PREVISTOS PARA : 09/12/2013 e 04/12/2014

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