



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Christian de Araujo Vieira

**Estudo dos efeitos na microcirculação cutânea do uso do gás carbônico
tópico medicinal**

Rio de Janeiro

2023

Christian de Araujo Vieira

Estudo dos efeitos na microcirculação cutânea do uso do gás carbônico tópico medicinal

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.^a Dra. Eliete Bouskela

Rio de Janeiro

2023

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

V658 Vieira, Christian de Araujo.
Estudo dos efeitos na microcirculação cutânea do uso do gás carbônico tópico medicinal / Christian de Araujo Vieira. – 2023.
59 f.

Orientadora: Prof.^a Dra. Eliete Bouskela

Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental.

1. Pele – Transplante – Teses. 2. Dióxido de carbono – Uso terapêutico – Teses. 3. Necrose – Terapia – Teses. 4. Microcirculação – Fisiologia – Teses. I. Bouskela, Eliete. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

CDU 612.79

Bibliotecário: Felipe Caldonazzo CRB7/7341

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Christian de Araujo Vieira

Estudo dos efeitos na microcirculação cutânea do uso do gás carbônico tópico medicinal

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 07 de dezembro de 2023.

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Eliete Bouskela (Orientadora)

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr. Daniel Alexandre Bottino

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr. Cesar Silveira Claudio da Silva

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dr. João Medeiros Tavares Filho

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof.^a Dra. Ângela Maria Fausto Souza

Fundação Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro

2023

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha esposa e filhos pelo amor e o apoio, aos professores pela dedicação e os ensinamentos, e a Deus pois sem ele não haveria este trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me mostrar os caminhos, iluminar meu raciocínio, dar-me forças nas dificuldades, e abençoar-me a cada dia.

À minha esposa Daniela por compreender, apoiar, dedicar-se e viver as minhas vitórias como suas também. Isso entendo como amor.

Aos meus filhos Miguel e Maitê por serem a razão de todo o meu esforço em ser um ser humano melhor a cada dia.

Aos meus pais Lincoln e Marilda pelo exemplo de amor, educação e dedicação que sempre foram.

A minha orientadora, Professora Eliete Bouskela, por acreditar no meu projeto, me inserir e mostrar o caminho da ciência, e ser para mim um grande exemplo profissional.

Ao Professor Jorge José de Carvalho por me acolher em seu laboratório e com sua experiência, ajudar-me na confecção e interpretação em muitas das amostras do trabalho.

A Fátima Zely Garcia de Almeida Cyrino (Laboratório de Pesquisas Clínicas e Experimentais em Biologia Vascular) pela grandiosidade e generosidade de me ensinar os detalhes da pesquisa experimental prática.

A todos, sem exceção, do Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental (FISCLINEX) e do Laboratório de Pesquisas Clínicas e Experimentais em Biologia Vascular (BIOVASC), pela excelência em ensino e pesquisa que são.

Tente uma, duas, três vezes e se possível tente a quarta, a quinta e quantas vezes for necessário. Só não desista nas primeiras tentativas, a persistência é amiga da conquista. Se você quer chegar onde a maioria não chega, faça aquilo que a maioria não faz.

Bill Gates.

RESUMO

VIEIRA, Christian de Araujo. **Estudo dos efeitos na microcirculação cutânea do uso do gás carbônico tópico medicinal**. 2023. 59 f. Tese (Doutorado Dissertação em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

A literatura é vasta em mostrar a busca da ciência pelo aumento da viabilidade de retalhos randomizados em modelos experimentais com amostras animais. Diversos métodos por agentes farmacológicos e físicos foram propostos, porém careciam de uma uniformidade de pesquisa que proporcionasse uma real comparação de seus resultados, que em sua maioria não apresentam significância científica. A técnica de infusão controlada de CO₂ medicinal (conhecida como Carboxiterapia) propõe a injeção tecidual de um gás de aplicabilidade local, de baixo custo, e efetiva ação na microcirculação. Este estudo foi executado baseado na infusão pré-cirúrgica controlada de CO₂ medicinal para potencializar a microcirculação regional e aumentar a viabilidade de retalhos cutâneos randomizados em dorso de hamsters. Oitenta e nove hamsters foram submetidos a injeção de CO₂ medicinal prévio a confecção de retalho randomizado de dorso de pedículo cranial de 5 x 1,5 cm. Em cinco grupos (20ml/min, 40ml/min, 60 ml/min, 80 ml/min e 150 ml/min) propusemos delinear o a melhor velocidade de infusão, propusemos definir também a número adequado de sessões de aplicação pré cirúrgica (uma, quatro e oito sessões), o plano de infusão (subcutânea e intradérmica), a necessidade de aquecimento (aquecido ou não); além de confrontar a utilização CO₂ com a de Nitrogênio (gás inerte). Resultados: obteve-se redução do percentual de necrose média de 50,76% do grupo controle para 1,86% no grupo tratado com CO₂ a 60 ml/min, 4 sessões de infusão pré-cirúrgica, intradérmica com gás aquecido. Houve expressão gênica no RT-PCR para HIF-1 alfa e VEGF na primeira sessão de infusão.

Palavras-chave: CO₂; retalho randomizado; hamsters; necrose; viabilidade.

ABSTRACT

VIEIRA, Christian de Araujo. *Effects on the skin microcirculation of the use of medicinal topical carbon dioxide*. 2023. 59 f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

The literature is vast in showing science's quest to increase the viability of randomized flaps in experimental models with animal samples. Several methods using pharmacological agents and physical methods were proposed, but they lacked a uniformity of research that would provide a real comparison of their results, which for the most part do not present scientific significance. The controlled infusion technique of medicinal CO₂ (known as Carboxytherapy) proposes the tissue injection of a gas that can be applied locally, is low cost, and has an effective action on the microcirculation. This study was carried out based on the controlled pre-surgical infusion of medicinal CO₂ to enhance regional microcirculation and increase the viability of randomized skin flaps on the back of hamsters. Eighty-nine hamsters underwent medical CO₂ injection prior to the creation of a 5 x 1.5 cm randomized cranial pedicle dorsum flap. In five groups (20ml/min, 40ml/min, 60 ml/min, 80 ml/min and 150 ml/min) we proposed to outline the best infusion speed, we also proposed to define the appropriate number of pre-surgical application sessions (one, four and eight sessions), the infusion plan (subcutaneous and intradermal), the need for heating (heated or not); in addition to comparing the use of CO₂ with that of Nitrogen (inert gas). Results: a reduction in the percentage of average necrosis was obtained from 50.76% in the control group to 1.86% in the group treated with CO₂ at 60 ml/min, 4 sessions of pre-surgical, intradermal infusion with heated gas. There was gene expression in the RT-PCR for HIF-1 alpha and VEGF in the first infusion session.

Keywords: CO₂; random-pattern flaps; hamsters; necrosis; viability.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Arco de Rotação Verdadeiro.....	15
Figura 2 –	Cadeira de Fumigação usada por Pierre Laloutte.....	16
Figura 3 –	Aparelho de infusão controlada de dióxido de carbono (Carboxiterapia).....	29
Figura 4 –	Marcação do retalho no dorso do hamster.....	30
Figura 5 –	Realização do retalho.....	30
Figura 6 –	Esquema da técnica de infusão intradérmica de dióxido de carbono....	31
Figura 7 –	Software ImageJ.....	34
Figura 8 –	Amostras do subgrupo controle no 14º dia após a realização do retalho	37
Figura 9 –	Amostras do subgrupo 20 ml/min no 14º dia após a realização do retalho.....	37
Figura 10 –	Amostras do subgrupo 40 ml/min no 14º dia após a realização do retalho.....	38
Figura 11 –	Amostras do subgrupo 60 ml/min no 14º dia após a realização do retalho.....	38
Figura 12 –	Amostras do subgrupo 80 ml/min no 14º dia após a realização do retalho.....	39
Figura 13 –	Amostras do subgrupo 150 ml/min no 14º dia após a realização do retalho.....	39
Figura 14 –	Gráfico relacionando dos resultados entre subgrupos de volume (ml/min) x percentual de necrose.....	40
Figura 15 –	Amostras do subgrupo uma sessão no 14º dia após a realização do retalho.....	41
Figura 16 –	Amostras do subgrupo quatro sessões no 14º dia após a realização do retalho.....	41
Figura 17 –	Gráfico relacionando dos resultados entre subgrupos de frequência x percentual de necrose.....	42
Figura 18 –	Amostras do subgrupo infusão subcutânea no 14º dia após a realização do retalho.....	43

Figura 19 – Gráfico relacionando dos resultados entre os subgrupos de infusão intradérmica e subcutânea com o percentual de necrose.....	43
Figura 20 – Amostras do subgrupo CO ₂ não aquecido no 14° dia após a realização do retalho.....	44
Figura 21 – Gráfico relacionando dos resultados entre os subgrupos de infusão intradérmica e subcutânea com o percentual de necrose.....	45
Figura 22 – Amostras do subgrupo Gás inerte (nitrogênio) no 14° dia após a realização do retalho.....	46
Figura 23 – Gráfico relacionando dos resultados entre os subgrupos de infusão CO ₂ com nitrogênio com o percentual de necrose.....	46
Figura 24 – Organograma demonstrando o desenho da pesquisa conforme resultados obtidos com a viabilidade cutânea (análise macroscópica)..	47
Figura 25 – Gráfico relacionando qRT-PCR para HIF-1 alfa do subgrupo controle com a das diversas frequências de sessões de infusão de CO ₂	48
Figura 26 – Gráfico relacionando qRT-PCR para VEGF do subgrupo controle com a das diversas frequências de sessões de infusão de CO ₂	49
Figura 27 – Gráfico relacionando qRT-PCR para TNF-alfa do subgrupo controle com a das diversas frequências de sessões de infusão de CO ₂	50
Figura 28 - Gráfico relacionando qRT-PCR para Caspase 3 do subgrupo controle com a das diversas frequências de sessões de infusão de CO ₂	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CO ₂	Dióxido de Carbono
O ₂	Oxigênio
USP	United States Pharmacology
pH	Potencial Hidrogeniônico
UNIFESP	Universidade Federal do Estado de São Paulo
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular
iNOS	Oxido Nítrico Sintetável Indutível
mRNA	Ácido Ribonucleico Mensageiro
EPO	Eritropoítina
CEUA	Comissão de Ética para o Cuidado e uso de Animais Experimentais
qRT-PCR	Quantitativa Transcriptase Reversa em Tempo Real
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
FGF-2	Fator de Crescimento Fibroblástico Tipo 2
FNT-alfa	Fator de Necrose Tumoral Alfa
HIF-1 alfa	Fator Induzido por Hipóxia 1 alfa
a.C.	Antes de Cristo
d.C.	Depois de Cristo

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
±	Mais ou menos
×	Multiplicação
β	Beta
α	alfa
ml	Mililitro
cm	Centímetro
°C	Graus Celsius
°	Graus
Kgf/cm ²	Quilograma força por Centímetro Quadrado
µg	Micrograma
n°	Número
mm	Milimetro
<	Menor
h	Hora
min	Minuto
mg/Kg	Miligramas por quilo
ATM	Atmosfera
J	Jaules
=	Igual
≤	Menor ou igual

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	14
1	OBJETIVOS	27
1.1	Geral	27
1.2	Específicos	27
2	MATERIAL E MÉTODOS	28
2.1	Desenho da Pesquisa.....	28
2.2	Animais	28
2.3	Equipamento.....	28
2.4	Técnica Operatória	29
2.5	Procedimento de Aplicação.....	31
2.6	Desenho Experimental.....	31
2.6.1	<u>Grupo 1- Grupo de análise da Velocidade de Infusão de CO₂.....</u>	31
2.6.2	<u>Grupo 2 – Grupo de análise da frequência de sessões de infusão de CO₂.....</u>	32
2.6.3	<u>Grupo 3 – Grupo de análise do plano de infusão do CO₂.....</u>	32
2.6.4	<u>Grupo 4 – Grupo de análise da necessidade de aquecimento do CO₂.....</u>	33
2.6.5	<u>Grupo 5 – Grupo de análise quanto a comparação com gás inerte (Nitrogênio).....</u>	33
2.7	Análise Macroscópica das Áreas Necrosadas.....	34
2.8	Técnica de PCR Quantitativo em Tempo Real (qRT-PCR).....	35
2.9	Método de Indução de Morte.....	35
2.10	Análise Estatística.....	35
3	RESULTADOS.....	36
3.1	Descarte de Grupo por Perdas.....	36
3.2	Resultados a partir da Análise Macroscópica.....	36
3.2.1	<u>Grupo 1 - Grupo de análise da Velocidade de Infusão de CO₂.....</u>	36
3.2.1.1	Subgrupo Controle	36
3.2.1.2	Subgrupo 20 ml/min.....	37
3.2.1.3	Subgrupo 40 ml/min.....	37
3.2.1.4	Subgrupo 60 ml/min.....	38
3.2.1.5	Subgrupo 80 ml/min.....	38

3.2.1.6	Subgrupo 150 ml/min.....	39
3.2.2	<u>Grupo 2 - Grupo de análise da frequência de sessões de infusão de CO₂</u>	40
3.2.2.1	Subgrupo 1 sessão de CO ₂	40
3.2.2.2	Subgrupo 4 sessões de CO ₂	41
3.2.3	<u>Grupo 3 - Grupo de análise do plano de infusão do CO₂</u>	42
3.2.3.1	Subgrupo Infusão Subcutânea.....	42
3.2.4	<u>Grupo 4 - Grupo de análise da necessidade de aquecimento do CO₂</u>	43
3.2.4.1	Subgrupo CO ₂ sem aquecimento.....	44
3.2.5	<u>Grupo 5 – Grupo de análise quanto a comparação com gás inerte (Nitrogênio)</u>	45
3.2.5.1	Subgrupo com infusão de gás inerte (Nitrogênio).....	45
3.3	Resultados a partir da Análise pela Técnica de PCR Quantitativo em Tempo Real (qRT-PCR)	47
3.3.1	<u>qRT-PCR para HIF-1 alfa</u>	48
3.3.2	<u>qRT-PCR para VEGF</u>	48
3.3.3	<u>qRT-PCR para TNF-alfa</u>	49
3.3.4	<u>qRT-PCR para Caspase 3</u>	50
4	DISCUSSÃO	51
	CONCLUSÃO	55
	REFERÊNCIAS	56
	ANEXO - Aprovação do Comitê de Ética	59

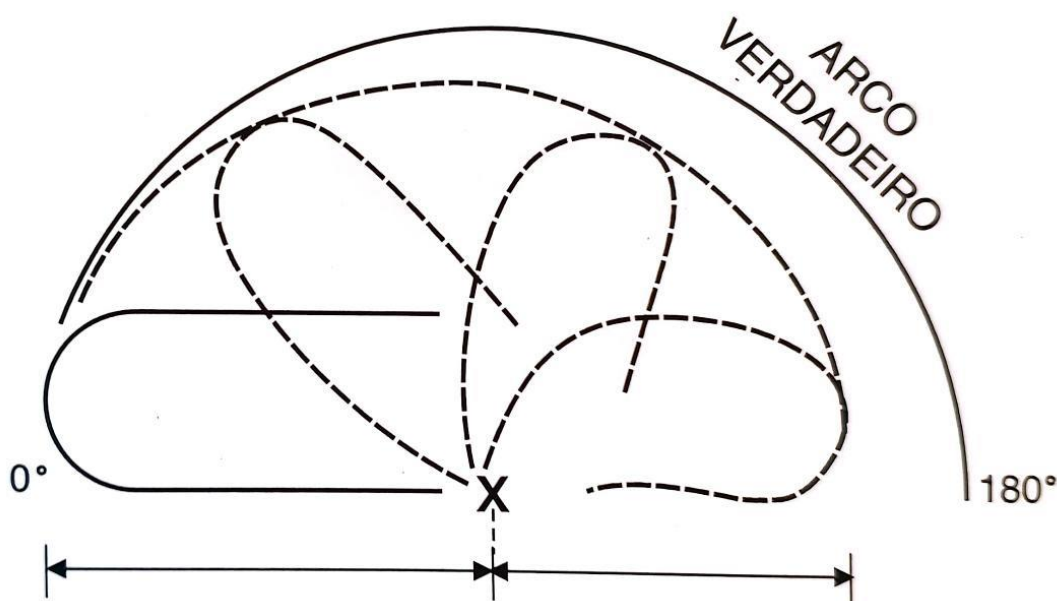
INTRODUÇÃO

A Cirurgia Plástica, em sua essência, utiliza como arsenal técnico os retalhos cutâneos, tanto para o âmbito estético como para o reparador. Os retalhos são usados na medicina desde aproximadamente o ano de 800 a.C., porém se popularizam com Tagliacozzi em por volta de 1500 d.C, com seu conhecido retalho de antebraço para reconstrução nasal (19). São caracterizados como segmentos de tecido transferidos de uma região para outra, mantendo com a primeira uma conexão vascular. Neste conceito, dividimos o retalho em pedículo (área que permanece como conexão com a área doadora, por onde passam os vasos nutridores) e seu corpo (área que compreende o retalho em si). O retalho necessita, por princípio básico, depois de mobilizado, dos vasos de seu pedículo; e no caso específico dos retalhos randomizados (vascularização ao acaso, sem pedículo axial dominante conhecido, e sim com plexo vascular nutridor em malha), dos vasos dos plexos sub-dérmicos e dérmicos.

Muitas das vezes, a manutenção do retalho por conta deste pedículo não se faz a contento, isto é, há comprometimento de sua viabilidade, principalmente em áreas mais distais a este pedículo. Tais áreas de sofrimento cutâneo podem comprometer o tratamento (a cobertura da área receptora), levando a um aumento do tempo de cicatrização e à perpetuação da fase inflamatória, muitas das vezes com cicatrização por segunda intenção, comprometendo a reparação desejada e o resultado estético, tendo como resultado uma deiscência cirúrgica e uma cobertura insuficiente do defeito a ser tratado. Resultados insatisfatórios na confecção de retalhos cutâneos com necrose podem alcançar 20%, segundo a literatura (20,37).

As principais causas de necrose tecidual são classificadas como fluxo arterial inadequado e fluxo venoso insuficiente. Várias teorias, levando também em consideração as proporções seguras adequadas da relação comprimento/pedículo do retalho (normalmente 3x1), foram aventadas (19). Quanto mais longo o retalho, melhor será a cobertura da área receptora, porém, por outro lado mais largo será a base deste pedículo em sua confecção de modo a nutrir este segmento, comprometendo sua rotação, mobilidade e capacidade reparadora. Vale ressaltar que quanto maior o arco de rotação, em graus do retalho, menor será seu avanço perdendo em comprimento, além da maior dobra destes vasos nutridores, maior a chance de isquemia e maior a chance de comprometimento do retalho, em proporções cada vez maiores (Figura 1).

Figura 1: Arco de Rotação Verdadeiro



Fonte: Melega, 2002.

Por conta da necessidade de garantir um suporte arterial mais viável a um retalho cutâneo, alguns artifícios técnicos são realizados na Cirurgia Plástica, como a autonomização, onde se procura, promovendo um meio de hipóxia, acidez e diminuição de fluxo sanguíneo no período pré-operatório, criar uma resposta de adaptação fisiológica com o aumento da circulação para melhorar a sobrevivência do retalho. O resultado das autonomizações já é cientificamente comprovado, porém, para este fim, é necessária uma alteração anatômica cirúrgica prévia à cirurgia proposta, um processo cicatricial em consequência de um procedimento cirúrgico prévio ao tratamento a ser instituído, aumentando a morbidade, os riscos cirúrgicos e anestésicos, além do aumento em gastos hospitalares.

A terapia com infusão médica subcutânea de CO_2 , também conhecida como carboxiterapia, tem sido amplamente utilizada com finalidade estética e terapêutica nos dias atuais. Quando se dá a interação, neste caso físico e químico, do CO_2 com o tecido, obtém-se o aumento da velocidade de fluxo e drenagem linfática no tecido local (3). Grande parte destas alterações ocorrem por conta do Efeito Bohr, onde a alta concentração de CO_2 tecidual facilita a liberação de O_2 pela hemoglobina; além de promover vasodilatação das artérias periféricas da microcirculação cutânea, abertura de capilares funcionalmente fechados, aumento da resposta venosa pós-capilar e periférica, estimulação do sistema nervoso autônomo simpático e parassimpático; além de promover resposta inflamatória aguda.

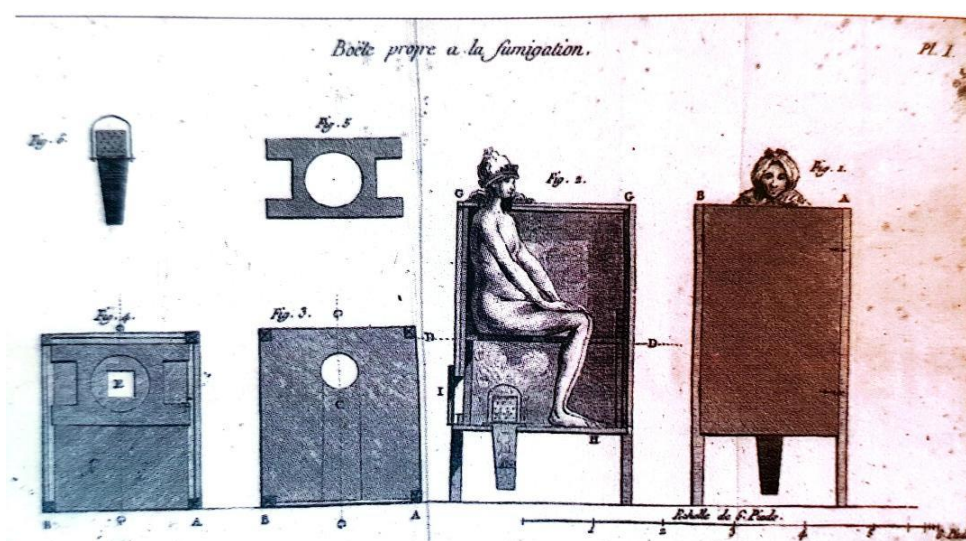
A Carboxiterapia é tida como um tratamento seguro, com incidência de complicações fatais em torno de 0,0002% a 0,59% (52), de baixo custo (27), baixo risco de alergias (24) e efeitos colaterais (25).

Na literatura o CO₂ é inicialmente citado como um gás termal. O início da utilização do gás carbônico como método terapêutico remonta da Idade Média, onde em 1151, na França, descreve-se o costume de se utilizar banhos de água carbonada em piscinas naturais de águas termais para o tratamento de diversas doenças (lesões cutâneas crônicas, cardíacas, vasculares, reumáticas e musculares), como, por exemplo, o “Fogo Sagrado de Santo Antônio”, doença caracterizada por abrir ferimentos cutâneos e sensação de queimaduras; atualmente denominada de erisipela. Esta técnica de tratamento foi publicada no livro “De magnética vulnerum naturalis et legitima curatione” por Johannes Batista Van Helmont em 1621 (28).

O CO₂ somente foi isolado (deixando de ser chamado de gás fixo) em 1754 por Joseph Black, a partir da combustão do carbonato de magnésio.

O primeiro método de tratamento seriado com o CO₂ foi realizado por Pierre Lalouette que expunha portadores de úlceras crônicas ao gás de forma seriada a cada dois ou três dias, publicando esta experiência no livro “Traite de Scrophulus Vulgairement Appeles Ecrounelles” em 1777. Para tal, ele utilizava a “cadeira de fumigação” (Figura 2) que apresentava uma câmara inferior utilizada para a combustão da magnésia alba, com um orifício superior para uma outra câmara, onde o corpo do paciente (exceto sua cabeça) ficava exposto ao CO₂ (3).

Figura 2: Cadeira de Fumigação usada por Pierre Laloutte



Fonte: <http://web.2.bium.univ-paris5.fr>

Quimicamente o gás carbônico é composto por um átomo de carbono e dois de oxigênio. Em temperatura ambiente e pressão atmosférica, a concentração de CO₂ é de aproximadamente 0,03%, na forma gasosa, incolor e não inflamável. Em meios internos (orgânicos), a ausência da polaridade entre as moléculas de CO₂ evita a sua interação (não reagem entre si e também não promovem atrações intermoleculares), mantendo-as livres, facilitando sua difusão em meios hidrofóbicos e hidrofílicos. Sua baixa massa e seu diminuto tamanho molecular atuam facilitando sua difusão nos diversos tecidos (18).

O CO₂ não é uma molécula estranha ao organismo, uma vez que participa ativamente do metabolismo biológico, sendo distribuída para todo o corpo pelo sistema cardiovascular. Quando ocorre a infusão controlada de CO₂, por injeção, diretamente no interior da pele, não há o bloqueio ou retenção das células durante a aplicação, mantendo-se nos tecidos o mesmo volume programado pelo aparelho insuflador de gás, tendo-se assim diferentemente dos banhos termais, 100% de aproveitamento do mesmo.

A terapêutica com CO₂ natural é comumente denominada “terapêutica termal”. Este tipo de procedimento utiliza o gás carbônico da natureza, sob a forma de água termal, gás termal e lama termal.

A lama termal atende a objetivos estéticos, recreativos e terapêuticos. A sua aplicação terapêutica direciona-se a patologias musculares e articulares, com duração de uso de 20 a 30 minutos localmente, na patologia em questão.

A água termal enriquecida com CO₂, em temperatura ambiente ou naturalmente aquecida, tem seu uso terapêutico em balneários, por permeação cutânea em banhos de imersão. A procura por estâncias de águas carbonadas apresenta dois períodos distintos no século XX; um primeiro período chamado de “terapêutico”, direcionado exclusivamente para o tratamento de patologias cardíacas, vasculares, reumatológicas, musculares e lesões cutâneas crônicas. O segundo período foi denominado de Terapêutico-Recreativo, aumentando a abrangência da utilização do CO₂, buscando-se também o relaxamento com temperaturas por volta de 38°C. No Século XXI, sua utilização fora das Estâncias Termas, criou um terceiro período denominado Terapêutico-Recreativo-Estético, com a constatação inicial das alterações distróficas da pele e tecido adiposo.

O gás carbônico quando produzido industrialmente recebe o nome de “Gás Carbônico Medicinal”, ou “Gás Carbônico USP” (United States Pharmacology), devendo ter um grau de pureza de no mínimo 99,5%, como condição obrigatória para sua utilização na área médica. Quando utilizado como infusão controlada deve ser acondicionado em cilindros de aço ou

alumínio para suportar a pressão interna de 58,3 kgf/cm², mantida por uma válvula acoplada ao cilindro e fixada por um sistema espiral de rosca.

Chamamos de carboxiterapia a técnica terapêutica de injeção de pequenas quantidades de gás carbônico de uso medicinal, com pressão de infusão controlada, nas regiões intradérmica e subcutânea.

Quando, com propósitos terapêuticos, o gás carbônico é utilizado para o tratamento de distúrbios vasculares periféricos (cicatrização de úlceras venosas, claudicação e fenômeno de Raynaud). Quando, com propósitos estéticos, ele é usado para melhora de rugas cutâneas, olheiras, celulite, rejuvenescimento cutâneo (melhorando o tônus e a textura) e o tratamento da alopecia.

O CO₂ promove o efeito Bohr, que resulta na mudança na curva de dissociação do oxigênio, com aumento da pressão de oxigênio a nível tecidual.

Fisiopatologicamente, esta técnica provoca um processo inflamatório agudo caracterizado por vasodilatação dos vasos periféricos e da microcirculação cutânea, aumentando o fluxo sanguíneo local. A vasodilatação ocorre pelo relaxamento do músculo liso da parede vascular.

A diminuição do pH local ocasionada pela concentração de CO₂ nos tecidos sinaliza aos receptores β-Adrenérgicos periféricos, que por meio da enzima fosfatase cinase estimulam a fosforilação da miosina presente no músculo liso vascular, levando a uma vasodilatação no local da infusão.

A distensão dos tecidos no momento da infusão estimula mecanicamente os receptores periféricos do sistema autônomo parassimpático para produzir acetilcolina. A acetilcolina atua promovendo a diminuição da resistência do vaso, através do processo de relaxamento do músculo liso da parede vascular, que depende da sua capacidade de inibir a abertura dos canais de cálcio intracelular.

São descritas na literatura (15) as seguintes contraindicações: insuficiência cardíaca severa, insuficiência respiratória severa, distúrbios da coagulação (ou em uso de anticoagulantes ou anti-agregantes plaquetários), acidente vascular encefálico, ataque isquêmico transitório, embolia pulmonar, infecções dermatológicas em evolução, afecções do tecido conjuntivo e alterações do processo de cicatrização.

A literatura não apresenta muitos estudos de relevância com o uso do CO₂ medicinal.

Abramo e colaboradores (2), na Revista Brasileira de Cirurgia Plástica em 2009, apresentaram um trabalho relativo ao aumento da temperatura cutânea após o uso da terapia de infusão controlada de CO₂ (Carboxiterapia) com média de 3,48°C. No mesmo estudo, antes e

após a infusão, foram feitas biópsias cutâneas analisadas para a avaliação histológica da vasodilatação em vasos periféricos, que alcançaram um aumento médio do diâmetro de 3,24 μm . Assim, estes autores concluíram que o aumento da temperatura cutânea foi alcançado pela vasodilatação com consequente aumento do fluxo de sangue no local.

Em outro trabalho Abramo e colaboradores (AP), na Revista Brasileira de Cirurgia Plástica em 2011, apresentam o resultado do uso da utilização da infusão controlada de CO_2 em úlceras de membros inferiores, com evolução média de 12 meses, a 0,5 cm da borda da ferida, com a agulha voltada para o tecido de granulação, com distância de 2,5cm entre as puncturas, a cada 72 horas, e coletaram biópsias antes e após a infusão. Observaram pós infusão aumento numérico dos capilares, macrófagos e fibroblastos e aumento das arteríolas pré-capilares em 3,4 vezes. Tal trabalho agilizou o fechamento das úlceras tratadas, melhorando a ferida granulada a ponto de torna-las aptas a receber um enxerto autólogo de pele.

Brandi e colaboradores (9), na revista In Vivo de 2010, publicaram um estudo sobre o efeito do dióxido de carbono medicinal no tratamento de feridas crônicas. Neste estudo um grupo foi tratado com as técnicas tradicionais e outro teve adição de carboxiterapia (duas vezes por semana por seis semanas), em locais previamente determinados, ao longo dos grandes eixos vasculares dos membros inferiores, na área sã dos bordos do ferimento, além de serem avaliados por laser-Doppler fluxometria e tensão de CO_2 . O grupo tratado apresentou tempo de cura da ferida mais rápido (25 contra 37 dias). Nas feridas não fechadas, o grupo tratado alcançou 85% de redução contra 60% nas não tratadas. Os pacientes descreveram menos episódios dolorosos nos membros inferiores e maior facilidade para deambular.

Penhavel e colaboradores (43) realizaram um estudo publicado na Acta Cirúrgica Brasileira em 2013, onde fizeram a infusão de CO_2 no subcutâneo do dorso de ratos (nos dias um, três, seis e nove do período pós-operatório) onde um retalho cirúrgico de 2,5 cm havia sido feito. Neste caso, em comparação ao grupo controle, não houve diferença significativa, isto é, não houve efeito na cicatrização aguda.

Durães e colaboradores (16) descreveram, em 2013, o uso do CO_2 em enxertos compostos de orelhas de coelhos (dois dias antes e no dia do procedimento, além dos dias cinco e doze do período pós-operatório), não tendo obtido resultados de sobrevivência dos enxertos significativamente consideráveis em comparação com o grupo controle.

Negrão MMC, Ferreira LM e colaboradores (31) da Universidade Federal de São Paulo, publicaram um estudo no European Journal of Plastic Surgery em 2021, realizaram um estudo em retalhos randomizados de trinta em seis ratos; onde foram alocados em 3 grupos: grupo 1 sem insulflação de CO_2 , grupo 2 com insulflação de CO_2 pós realização do retalho por 7 dias

seguidos, e grupo 3 com insuflação de gás inerte (hélio) por 7 dias seguidos. A insuflação foi realizada em plano subcutâneo com agulha 0,2mm à 90° da superfície da pele, em 2 segmentos do retalho, num volume de 150 ml/min sem aquecimento. Os mesmos alegam não terem obtido resultados significativos estatisticamente em vascularização, infiltrado inflamatório nem em percentual de área necrótica.

A autonomização trata-se de procedimento cirúrgico prévio à cirurgia do retalho propriamente dita, onde se faz uma secção de parte do suprimento sanguíneo do futuro retalho. Neste caso expomos o retalho a um grau de isquemia proposital, autolimitada, porém transitória para que haja o estímulo da vascularização local (vasodilatação e formação de novos vasos) (12). O mesmo pode se confeccionado de 2 maneiras (38):

- a) Procedendo-se a ligadura ou secção do pedículo vascular principal (que seria seccionado no ato da cirurgia sem que o mesmo seja descolado do seu próprio leito;
- b) Procedendo-se a realização de um retalho bi-pediculado com seu descolamento do leito doador.

Normalmente, o período mínimo para o procedimento cirúrgico final proposto é de aproximadamente trinta dias, para que se tenha tempo de ocorrer todas as alterações vasculares que garantam maior viabilidade ao retalho. Com este procedimento, alcança-se uma maior sobrevida da ponta do retalho, área mais distante do suprimento vascular oriundo do pedículo, que por esta razão é a mais propensa a eventos isquêmicos e necróticos. Segundo estudos de Reinisch (1974) (46) o estímulo para o aumento da vascularização interna do retalho viria da isquemia controlada provocada, da secção de nervos simpáticos e pela liberação de substâncias inflamatórias oriundas do descolamento do retalho. Em seu trabalho, Molina (2013) (40) confirma a teoria de Reinich, concluindo que “um potencial mecanismo para contrabalançar a hipoxia tecidual é a indução à angiogênese. Hipóxia estimula novos vasos por numerosas vias pró-angiogênicas”.

Os retalhos cutâneos randomizados são segundo seu suprimento sanguíneo desprovidos de um pedículo vascular definido. Recebem fluxo sanguíneo das artérias miocutâneas, que enviam ramos para formar os plexos subdérmico e dérmico.

Com o objetivo de propor um desenho de retalho que evitasse um alto percentual de necroses após sua confecção, McFarlane em 1965 (30) propõe um trabalho com o desenho de um retalho propondo proporções que alcançariam uma segurança contra eventos necróticos similar a uma autonomização, buscando um situação que beirasse os extremos da sobrevivência e da fase de isquemia / necrose. Desse modo é proposto um retalho de dorso de rato com

proporções de 10 X 4 cm, com pedículo superior, inter-escapular, elevando o *panniculus carnosus*. Segundo este trabalho, por volta de 7 a 10 dias de procedido o retalho, tem-se já definido os segmentos necróticos do mesmo. Este trabalho tornou-se tão expressivo em fornecer um modelo de desenho de retalho randomizado seguro, que vem sendo utilizado como referência a diversos trabalhos experimentais para o estudo da Microcirculação Cutânea em modelos animais em diversos centros de pesquisa.

Em 2014, Camargo e colaboradores da Universidade de São Paulo (11) propuseram um novo modelo experimental, um modelo modificado de McFarlane, para o estudo da viabilidade de retalhos cutâneos em ratos. Este estudo propõe um novo consenso para de um desenho básico de retalho experimental de dorso de ratos. Apresenta-se como um retalho de pedículo cranial (interescapular), com dimensões de 10 X 3 cm, elevando-se o *panniculus carnosus*. Este desenho se apresentou 40% de sua área necrosada, 10 vezes mais quando comparada a necrose observada nos estudos de McFarlane. Desse modo, o estudo de McFarlane por não induzir significativa área de necrose, desse modo não sendo tão indicado a estudos que busquem melhorar a viabilidade cutânea tecidual cutânea.

A manutenção da viabilidade é o maior objetivo na confecção de retalhos cutâneos randomizados. Vários tratamentos têm sido instituídos em diversos centros de pesquisa com o objetivo de diminuir, ou até mesmo neutralizar a ocorrência da necrose distal.

Para alcançar-se esta melhora da viabilidade de retalhos randomizados, vários centros utilizaram agentes farmacológicos diversos com resultados estatisticamente positivos.

Nakano e colaboradores (41), em 1998, em Saitama Medical School no Japão utilizaram o transplante de fragmentos de microvasos em retalhos randomizados do dorso de ratos, com a finalidade de aumentar a sobrevida em retalhos isquêmicos com aumento do fluxo sanguíneo. Os autores alcançaram aumento da sobrevida do retalho após sete dias, e demonstraram aumento das arborificações (angiogênicas) na proximidade no tecido. Em retalhos com proporções de 10x2 cm (comprimento x base), alcançaram sobrevida de $0,598 \pm 0,014\%$ no grupo não tratado e $0,712 \pm 0,015$ no grupo tratado.

No ano de 2004, Karaçal e colaboradores (32) utilizaram licocaina e prilocaina (ação mio-relaxadora vascular) em retalhos randomizados de dorso de ratos medindo 10 X 3 cm, e obtiveram diferença estatística no cálculo do percentual de necrose com o grupo controle no grupo tratado com prilocaina. A área que sobreviveu do retalho no controle foi em média de 15,6% e no grupo da prilocaína de 81,2%.

No ano de 2009, Livaoglu e colaboradores (36) publicaram no Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery a utilização de Hirudoid (agente anticoagulante,

fibrinolítico e antiinflamatório) diariamente sobre retalhos de dorso de ratos de 10 X 3 cm de base caudal, e no décimo dia avaliou-se a viabilidade do retalho. Como resultado obteve-se como média de necrose no grupo controle 48,9% e no grupo tratado de 31,9%. O autor entende como sendo a ação anti-coagulante do Hirudoide a razão dos resultados obtidos.

Num estudo da UNIFESP de 2010, Godoy e colaboradores (23) utilizaram a Capsaicina (conhecida por seu poder inibidor plaquetário e vasodilatador) em retalhos de ratos com dimensões de 10 X 4 cm, em bandagens pós cirúrgicas por 35 min por 2 dias consecutivos. O percentual de pele necrosada foi calculado no 7º dia pós cirúrgico. Houve diferença estatística significativa, onde no grupo controle o percentual médio de necrose foi de 44,75% e no tratado foi de 35,07%.

Gao e colaboradores (21) em 2011, do Departamento de Cirurgia Plástica do Hospital da Universidade de Medicina de Xinjiang na China, realizaram um estudo visando o aumento da neovascularização usando células tronco humanas derivadas de células adiposas, em retalhos randomizados em dorso de camundongos com diabetes induzida por estreptozotocina. O estudo pressupõe que as células tronco, derivadas células adiposas, podem ser úteis para aumentar a sobrevida em tecidos de diabéticos, pelo seu múltiplo potencial de diferenciação, além de promover produção de inúmeros fatores de crescimento promotores de angiogênese e deposição de matriz extracelular. O estudo em questão demonstrou um aumento da viabilidade dos retalhos de 47% no grupo controle para 83,2% no grupo tratado, onde houve aumento dos níveis de HIF1- α diretamente relacionada ao aumento do VEGF ($p < 0,01$).

Ozturk e colaboradores (42), em 2012, fizeram retalhos randomizados medindo 10x3 cm em dorso de ratos Wistar, induzindo clinicamente diabetes com estreptozocina e utilizando aminoguanidina (composto que inibe a indução do óxido nítrico sintetase, iNOS, e diminui a produção de óxido nítrico nos tecidos). O grupo controle apresentou necrose média de 50,9% ($\pm 0,13$), o grupo não diabético tratado com aminoguanidina 32,9% ($\pm 0,12$), o grupo diabético não tratado 65,2% ($\pm 0,11$) e o grupo diabético tratado com aminoguanidina 43,5% ($\pm 0,14$); com valores de $p < 0,05$. Assim, o estudo sugere que a necrose em retalhos randomizados, principalmente em ratos com diabetes induzida, pode ter um importante componente dependente dos radicais livres locais e o uso da aminoguanidina pode influenciar positivamente essa sobrevida cutânea.

Fayazzadeh e colaboradores (17), no periódico Archives of Iranian Medicine, em 2012, produziram um estudo onde avaliaram, em retalhos randomizados (medindo 8x2 cm em dorso de ratos com pedículo caudal), o efeito do Fator de Crescimento de Fibroblastos-2 (FGF-2) e da eritropoietina, na necrose em retalhos isquêmicos. Como resultados obtiveram o percentual

de necrose no grupo controle de $41,07 \pm 7,01\%$; no grupo tratado com FGF-2 $7,67 \pm 1,79\%$ e no da eritropoietina $19,79 \pm 1,56\%$, com diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,01$).

Chen e colaboradores (13) no ano de 2013 procederam aplicações de Atorvastatina em ratos submetidos a retalhos randomizados de dorso e colheu VEGF mRNA na base e na ponta do retalho. O mesmo obteve apenas valores consideráveis de VEGF mRNA na base do grupo Atorvastatina, e o mesmo atribui a isso a melhor na sobrevivência dos retalhos tratados.

Em 2016 Zhou e colaboradores publicaram um estudo na revista Nature (53) utilizando o Calcitriol (que tem ação no metabolismo do Cálcio e na promoção da gênese do VEGF) por injeção intraperitoneal 2 horas após a realização do procedimento cirúrgico (um retalho de dorso de ratos com medidas de 9 X 3 cm), e depois diariamente por 7 dias. Conseguiu-se como resultado a melhora do edema e diminuição de área de necrose no grupo tratado, estatisticamente considerável, além de induzir produção de VEGF mRNA.

No ano de 2018 Serin e colaboradores (49) propuseram a utilização de sildenafil (inibidora da enzima fosfodiesterase tipo 5, induzindo a vasodilatação), no tecido subcutâneo, em retalhos de base caudal em dorso de ratos com dimensões de 9 X 3 cm, seguidamente por 7 dias prévios a cirurgia. Como resultado houve diminuição das células inflamatórias e aumento do número de capilares formados. A área de necrose após 7 dias foi de 18,29% no grupo tratado e de 42,26% no grupo controle. O autor ressalta a utilização com cuidado às doses devido ao grande número de efeitos colaterais.

No mesmo ano de 2018, Saito e colaboradores (48) publicaram um trabalho onde submetiam ratos com retalhos randomizados de dorso a aplicação transdérmica tópica de Gás Carbônico pelo veículo hidrogel, no pós operatório diariamente por 5 dias. O grupo tratado obteve aumento estatisticamente comprovado em expressão gênica de VEGF, fator de crescimento fibroblástico básico e na viabilidade do retalho tratado no quinto dia pós operatório (média de 88,3% no grupo tratado contra 71,2% no grupo controle). A expressão genética do HF1 alfa não obteve alteração significativa na amostra tratada e no controle.

Alguns agentes farmacológicos utilizados trouxeram sua contribuição científica, porém sem resultados estatisticamente significativos.

O uso tópico de pomada de Nitroglicerina a 2% foi utilizado por Rohrich (47) em 1994, em retalhos de 8 X 8 cm em abdome de ratos, por 1 hora antes da cirurgia, e reaplicado a cada 6 horas por 3 dias. A área viável dos retalhos após 3 dias não demonstrou diferença estatística significativa com o grupo controle.

Em um estudo realizado na Turquia por Bekerecioglu em 1998 (8), o autor submeteu ratos com retalhos randomizados de dorso, 10 amostras por grupo, de pedículo inferior (caudal) com dimensões de 10 X 3 cm, a diversas substâncias químicas conhecidamente anti-oxidantes. Num primeiro grupo fez o controle, no segundo Vitamina C intraperitoneal, no terceiro grupo Vitamina E via intramuscular, no quarto grupo deferoxamine via intraperitoneal e no quinto grupo ginkgo biloba. Resultados demonstraram que Vitamina C, ginkgo biloba e deferoxamine interferem positivamente na sobrevivência de retalhos randomizados; em contrapartida a vitamina E não demonstrou qualquer diferença estatística.

Num estudo em 2004 realizado por Akan e colaboradores (5), utilizou-se o modelo de retalho de dorso em ratos com pedículo caudal com dimensões de 10 X 3 cm, onde um grupo foi tratado, no pré-operatório com 3 doses (48h / 24h / e 30 min), com Aspirina em altas doses (200mg/Kg), com ação anti-inflamatória e anti-agregante plaquetária; e em outro clopidogrel (50mg/Kg), um inibidor plaquetário. A diferença da viabilidade no comparativo entre os grupos e o controle não demonstrou diferença estatística.

Em 2006, Bayat (7) procedeu em ratos um tratamento pré cirúrgico de 30 dias com pentoxifilina, realizando depois retalhos de 7 X 2 cm de pedículo caudal. O mesmo observou que em comparação ao grupo controle (não tratado), houve um significativo aumento na proliferação de fibroblastos, de colágeno organizado, de tecido de granulação e no percentual de sobrevivência dos retalhos tratados.

Shalom e colaboradores (50) publicaram na American Society for Dermatologic Surgery, em 2008, um trabalho com o uso do ácido hialurônico injetável na base de retalhos randomizados medindo 8 x 2 cm em dorso de ratos. O ácido hialurônico é um polissacarídeo linear, produzido pela membrana celular para o meio extracelular, sendo sua concentração alta na pele humana. A esta substância se atribuem propriedades auxiliares da cicatrização em estágios recentes, pela promoção da migração e proliferação celular, estimulando a angiogênese e a granulação da ferida além de modular o processo inflamatório local. O estudo em questão não obteve uma melhora significativa na sobrevida cutânea, com diferenças da sobrevivência medida no comprimento do retalho com 46,7 mm no grupo tratado e 40,6 mm no grupo controle ($p < 0.2$).

Em 2009 Coelho da Mota do Laboratório de Pesquisas Clínicas e Experimentais em Biologia Vascular da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (14), submeteu substâncias vasoativas como Buflomedil (um agente bloqueador do receptor alfa) e a Pentoxifilina (inibidor da fosfodiesterase). Um retalho de dorso em hamsters de pedículo inferior (caudal), 6 X 2 cm. Procedeu-se a avaliação da microcirculação com o Cytoscan. Além do percentual de necrose

dos retalhos tratados comparativamente com o grupo controle, também foram avaliados os seguintes parâmetros: a densidade capilar funcional, distância da cessação do fluxo sanguíneo deste a base do retalho e análise qualitativa do fluxo sanguíneo. Como resultados o Bufomedil conseguiu melhores valores de densidade capilar funcional em 1 hora e em 24 horas, porém não houve diferença dos 3 grupos quando buscou-se avaliar a distância da cessação do fluxo a partir da base do retalho em 1 e 24 horas. Não houve diferença estatística no percentual de áreas viáveis do retalho nos grupos estudados. O estudo demonstra também que, nas dimensões propostas pelo autor, desde a confecção cirúrgica do retalho, a metade distal ao pedículo não apresenta qualquer fluxo sanguíneo, irrecuperável em todo o período de estudo das amostras, resultando em morte tissular de aproximadamente 50%.

Milch e colaboradores (39), em 2010, fizeram um retalho de dorso em ratos Wistar, baseado caudalmente medindo 9x3 cm, com injeção de monócitos potencialmente angiogênicos. Foi comparada a vascularização e a viabilidade cutânea com um grupo controle após uma semana. Não houve diferenças significativas da viabilidade cutânea entre os grupos, mas encontrou-se uma densidade vascular maior que 50% no grupo tratado, demonstrando que nem sempre o aumento da densidade vascular é acompanhado de aumento da viabilidade e sobrevivência tecidual.

Em 2012 Fayazzadeh e colaboradores (17) realizaram um estudo com retalho de dorso em ratos de pedículo caudal, com dimensões de 8 X 2 cm. Neste experimento o mesmo injetou em 3 dias consecutivos no subcutâneo dos ratos em um grupo eritropoietina (EPO) e em um segundo grupo Fator de Crescimento Fibroblástico tipo 2 (FGF-2) e confrontaram os resultados da viabilidade dos retalhos com o grupo controle. Ambos são conhecidos como promotores de angiogênese. Infelizmente não houve diferença estatística a respeito da melhora da viabilidade dos retalhos nos 3 grupos.

Em 2016 Haktanir e colaboradores (26) publicaram em 2016 a utilização do Fator 1 de crescimento insulina-like (ação anabólica e estimuladora de crescimento de diversas células corporais) via injeção diária por 7 dias em subcutâneo de retalhos de dorso com pedículo caudal de 9 X 3 cm. Não houve diferença estatística da sobrevivência dos retalhos em comparação com o grupo Controle.

Alguns agentes físicos também foram utilizados no intuito de promover angiogênese.

A utilização de oxigenioterapia hiperbárica (2ATM) sobre os retalhos de dorso em ratos (neste caso retalhos tubulares e não randomizados). No trabalho apresentado por Richards e colaboradores em 2003 (45), os mesmos dividiram as amostras em 3 grupos: um grupo foi tratado antes da divisão do pedículo, no segundo grupo após a divisão do retalho e o terceiro

foi o controle. O grupo obteve resultados significativos no percentual de sobrevivência de retalhos após o 5º dia, onde as médias de sobrevivência de retalhos foram de 69,19% no tratamento prévio, 71,22% no tratamento pós e de 27,9% no controle. Os mesmos atribuem este resultado pela provável capacidade da técnica de potencializar a microcirculação, e de reduzir a agregação plaquetária, tudo isso aliado a capacidade do plasma de carrear oxigênio em áreas onde as hemácias não conseguem inicialmente alcançar.

Em 2011 Adams e colaboradores (04) submetem feridas em dorso de ratos, em grupos diferentes, à luz de Led azul e vermelha e confrontaram resultados com o grupo controle. Após 10 minutos diários em uma semana as feridas foram comparadas e houve diferença estatística na cicatrização tecidual e no tamanho das feridas submetidas a luz azul. Um dos mecanismos atribuídos parece ser sua ação no metabolismo do Óxido Nítrico, o que pode provocar melhor perfusão tecidual, mediar cicatrização tecidual e ativar fatores de crescimento e migração de células endoteliais.

Os efeitos Laser sobre retalhos cutâneos foram testados por Baldan e colaboradores (6) em 2012. Os mesmos submetem diferentes energias por ponto de Diodo Laser 670nm. Obtiveram diferença estatística relevante no grupo onde ofertaram 0,57J nos retalhos randomizados de ratos com dimensões de 10 X 4 cm de pedículo cranial em comparação ao controle. Os autores alegam que esta resposta se deve à ação sobre os radicais livres, aos quais se atribui efeitos isquêmicos de destruição tecidual.

1 OBJETIVOS

1.1 Objetivo geral

Este trabalho tem como principal objetivo estudar os efeitos locais do uso dióxido de carbono medicinal, no preparo pré operatório, em retalhos randomizados de dorso de Hamsters e avaliar seu comportamento quanto à sobrevivência deste segmento cutâneo, comparativamente com o tecido não tratado, no pós-operatório, sob diversos critérios como: dosagem de volume infundido (ml/min), tempo prévio de tratamento, influência no aquecimento do gás, plano de infusão (intradérmico ou subcutâneo), e da real ação do CO₂ como substância efetora (em confronto com um gás inerte).

1.2 Objetivos específicos

Com a infusão controlada do CO₂, antes da realização de retalhos no dorso, em modelos experimentais de hamsters dourados, procurou-se:

- a) Avaliar a sobrevivência dos retalhos cutâneos tratados previamente;
- b) Isolar diversos vieses para tentar entender a real importância de cada um na aplicação;
- c) Alcançar por critério de seleção dos melhores resultados em cada grupo, o melhor cenário de aplicação do CO₂ para o objetivo de aumento da viabilidade cutânea;
- d) Estudar por meio da técnica de PCR em Tempo Real (RNA_m) o comportamento do Fator de Necrose Tumoral- α , Caspase 3, Fator de Crescimento Vascular Endotelial e Fator de Indução a Hipóxia 1 alfa.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Desenho da Pesquisa

Realizado um estudo experimental, longitudinal, randomizado, pelo método analítico, prospectivo, simples-cego e conduzido em apenas um centro de pesquisa.

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para o Cuidado e uso de Animais Experimentais (CEUA) do Instituto de Biologia Roberto de Alcântara Gomes da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), registrada com o número 35/2016. Este estudo encontra-se em conformidade com os preceitos da Lei nº 11.794 de 08 de outubro de 2008.

2.2 Animais

Hamsters Sírios Dourados (*Mesocricetus auratus*), em número de 89 com idade aproximada de 23 dias, fêmeas, pesando entre 170 e 190 gramas, e foram mantidos em biotério, com ciclo claro/escuro, umidade e temperatura (22°C) controlados. Os animais permaneceram em gaiolas de plástico apropriadas, contendo maravalha, com acesso *ad libitum* a água potável. Receberam como ração uma dieta apropriada de Nuvital (Nuvilab, Curitiba, PR, Brasil).

2.3 Equipamento

O aparelho utilizado para a infusão do CO₂ foi o aparelho de Carboxiterapia da marca Estek de uso médico (tipo Carbtek Advanced Duplo Canal Plus da DAF. Ind. E Com. de Equipamentos Tecnológicos Ltda – São Paulo – Brasil) com registro na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) /Ministério da Saúde Brasileiro nº 1.035.769.0004. Este aparelho contém parâmetros de aquecimento do gás CO₂ no cilindro para a temperatura

ambiente (com o intuito de evitar dor e vasoconstricção local por um gás gelado), e um regulador digital de velocidade de infusão do gás (Figura 3).

Figura 3 - Aparelho de infusão controlada de dióxido de carbono (Carboxiterapia)



Fonte: O autor, 2023.

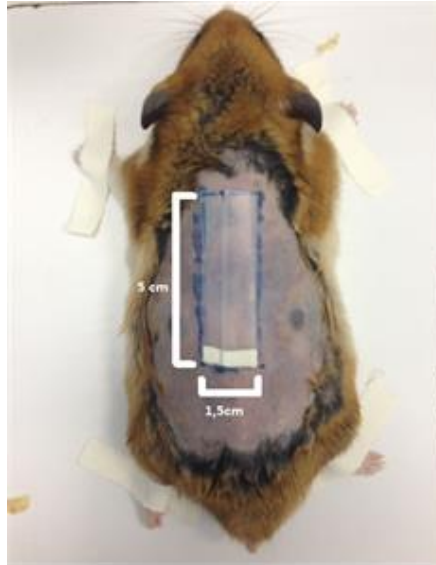
2.4 Técnica operatória

Os animais foram anestesiados por via intra-peritonal com hidrocloreto de ketamina (10 mg/Kg) e hidrocloreto de xilazina (50 mg/Kg), usando seringa de 1 ml com agulha hipodérmica de 4,5x13mm. Realizada tricotomia seguida de assepsia com álcool 70%

Realizou-se a elevação de um retalho de dorso, retangular, compreendendo pele e *panniculus carnosus*, com 50 mm de comprimento e largura de 15 mm (figura 4); tendo em sua base cranial (região entre as escápulas, área de suprimento sanguíneo), onde para tal utilizamos um molde plástico transparente e uma caneta dermatográfica. Durante o procedimento cirúrgico o retalho é elevado, totalmente liberado de seus ramos vasculares nutridores cutâneos e trans-musculares, mantendo conexão vascular apenas pelos vasos cutâneos de sua base (Figura 5) . A incisão foi realizada com lâmina n 15, e no momento da elevação deste retalho, um fragmento cutâneo distal de 5 mm de comprimento e 15mm de largura foi ressecado para análise pela técnica de PCR Quantitativo em Tempo Real (qRT-PCR). Após a ressecção destes fragmentos distais, o restante do retângulo do retalho cutâneo foi colocado novamente sobre o antigo leito, mimetizando a realização de uma cobertura de um defeito tecidual, e posteriormente suturado

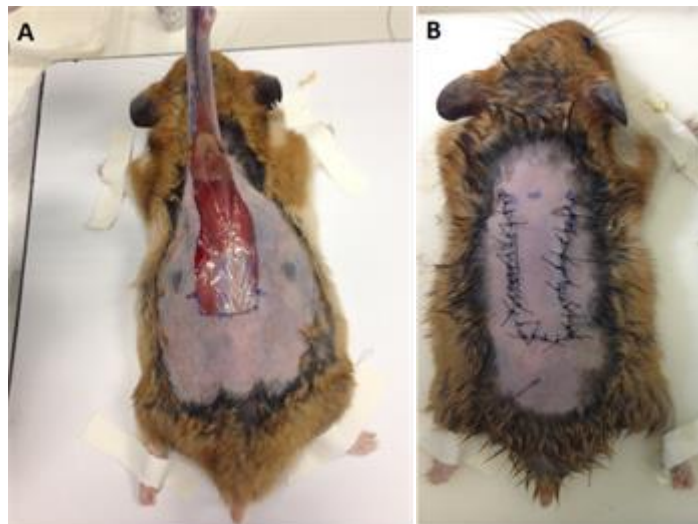
as bordas do defeito, com fio monofilamentar de nylon 4.0, em número de 11 pontos simples, sem tensão tecidual.

Figura 4: Marcação do retalho no dorso do hamster



Fonte: O autor, 2023.

Figura 5: Realização do retalho



Legenda: a) detalhe da elevação do retalho cutâneo, demonstrando secção de todos os vasos nutritores do segmento, exceto no segmento interescapular (pedículo cranial); b) Retalho acomodado no leito previamente descolado.

Fonte: O autor, 2023.

A cirurgia foi realizada apenas pelo pesquisador principal. O protocolo cirúrgico foi baseado no modelo de retalho randomizado experimental de McFarlane modificado por Camargo (11) adaptado para hamsters (para as mesmas proporções largura x comprimento).

2.5 Procedimento de aplicação

Realizou-se aplicação, pré-cirúrgica, para a infusão do CO₂ medicinal com uma agulha hipodérmica de 4,5x13mm conectada ao aparelho de Carboxiterapia por meio de um conjunto estéril de uso único de látex. Houve aplicação dentro da área pré determinada pelo molde plástico no dorso do animal, com a agulha inserida à pele em um ângulo de 15°, com o bisel para cima, evitando penetrar no subcutâneo, procedendo uma aplicação predominantemente intradérmica, num número preconizado de 15 puncturas (para equalizar o trauma das perfurações em todas as amostras) (figura 6). Procedendo deste modo, a difusão do gás na pele é vista de modo ectoscópico, assumindo o seguimento cutâneo um aspecto marmóreo, em trama, de coloração branca, que em sua grade totalidade acaba ultrapassando as margens do desenho do retalho, tratando também a área marginal externa.

Figura 6 - Esquema da técnica de infusão intradérmica de dióxido de carbono



Fonte: Philippe, 2008.

2.6 Desenho Experimental

Os hamsters foram divididos foram alocados aleatoriamente em 5 grandes grupos, e nestes subdivididos em subgrupos quando necessário, conforme a estratificação da Metodologia de Estudo abaixo:

2.6.1 Grupo 1- Grupo de análise da Velocidade de Infusão de CO₂

Neste grupo alocamos 8 amostras em cada um dos 6 sub-grupos. Cada Subgrupo comporta uma das 5 velocidades de infusão do CO₂ que apresenta o aparelho, além do grupo Controle. Realizada infusão intradérmica, com gás aquecido, com intervalo entre sessões de 3 dias, num total de 8 sessões. Após a última aplicação, aguardamos mais um período de 3 dias para realizar o procedimento cirúrgico do retalho:

- Subgrupo Controle: Sem infusão de CO₂, apenas realizado o procedimento cirúrgico;
- Subgrupo 20 ml/min;
- Subgrupo 40 ml/min;
- Subgrupo 60 ml/min;
- Subgrupo 80 ml/min;
- Subgrupo 150 ml/min.

2.6.2 Grupo 2 – Grupo de análise da frequência de sessões de infusão de CO₂

Neste grupo de modo seletivo, alocamos o melhor resultado de viabilidade cutânea do retalho quanto a velocidade de infusão aplicada do grupo 1, e neste mesma velocidade de infusão, em infusão intradérmica, com gás aquecido, com intervalo de sessões de 3 dias, alocamos 8 amostras em três subgrupos:

- Subgrupo única sessão;
- Subgrupo 4 sessões;
- Subgrupo 8 sessões.

2.6.3 Grupo 3 – Grupo de análise do plano de infusão do CO₂

Neste grupo de modo seletivo, alocamos o melhor resultado de viabilidade cutânea do retalho quanto a velocidade de infusão aplicada do grupo 1, e quanto a quantidades de sessões

do grupo 2; e nestes mesmos volumes e sessões, com gás aquecido, com intervalo de sessões de 3 dias, alocamos 8 amostras em dois subgrupos:

- Subgrupo infusão intradérmica;
- Subgrupo infusão subcutânea.

2.6.4 Grupo 4 – Grupo de análise da necessidade de aquecimento do CO₂

Neste grupo de modo seletivo, alocamos o melhor resultado de viabilidade cutânea do retalho quanto a velocidade de infusão aplicada do grupo 1, quanto a quantidades de sessões do grupo 2; e quanto ao plano de infusão do grupo 3, e nestes mesmos volumes, sessões e plano de infusão, com intervalo de sessões de 3 dias, alocamos 8 amostras em dois subgrupos:

- Subgrupo com CO₂ aquecido;
- Subgrupo sem CO₂ aquecido.

2.6.5 Grupo 5 – Grupo de análise quanto a comparação com gás inerte (Nitrogênio)

Neste grupo de modo seletivo, alocamos o melhor resultado de viabilidade cutânea do retalho quanto a velocidade de infusão aplicada do grupo 1, quanto a quantidades de sessões do grupo 2, quanto ao plano de infusão do grupo 3, quanto a necessidade de aquecimento do grupo 4; e nestes mesmos volumes, sessões, plano de infusão e aquecimento ou não do CO₂, com intervalo de sessões de 3 dias, alocamos 8 amostras em dois subgrupos:

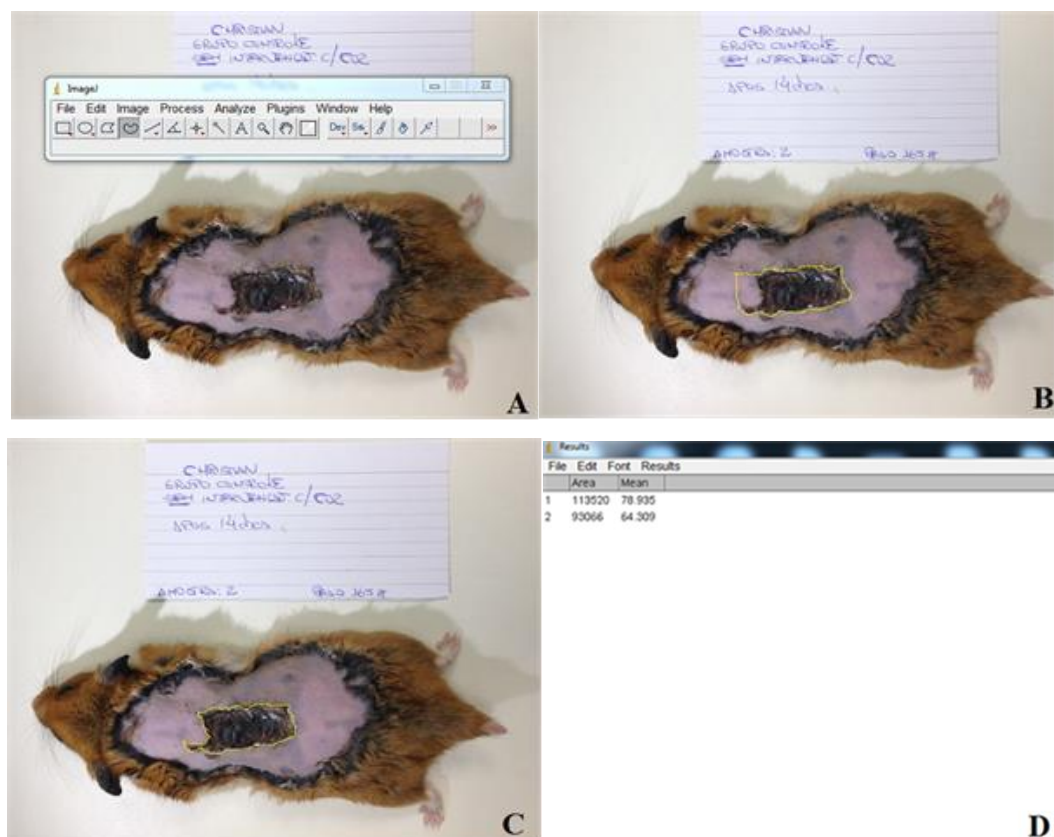
- Subgrupo com infusão de CO₂
- Subgrupo com infusão de gás inerte (Nitrogênio)

Durante o período de tratamento pré-cirúrgico os oito animais do grupo ficaram numa mesma gaiola, sendo separados em gaiolas individuais somente após a realização do retalho, neste caso para evitar canibalismo. Os Hamsters somente foram mortos após este período de observação de quatorze dias após a cirurgia.

2.7 Análise Macroscópica das Áreas Necrosadas

Todas as amostras dos grupos a partir do D0 (dia da realização do retalho cutâneo) foram acompanhados quanto a evolução da área de necrose do retalho. No décimo quarto dia as amostras foram novamente anestesiadas e fotografadas em posição pronada numa igual distância de 40cm. A área de viabilidade do retalho foi calculada conforme análise computadorizada pelo Software de Domínio Público ImageJ de Processamento e análise de imagens (Wayne Rasband, NIH, <http://rsbweb.nih.gov/ij/>) (Figura 7). Todas as imagens foram calibradas para leituras em mm². Por conta do fenômeno de contratura tecidual de feridas e dos tecidos, a área total do retalho ao fim dos 14 dias é consideravelmente menor que a realizada no D0. Na demarcação de pele viável no baseamos nos critérios de Gemperli e colaboradores (22); com tecido sadio apresentando características de coloração rósea, morno e macio ao toque; enquanto áreas necróticas são definidas como de coloração marrom a preta, fria e endurecida.

Figura 7 - Software ImageJ



Legenda: a) Fotografia da amostra; b) Todo o segmento cutâneo do retalho marcado; c) Apenas a área de sofrimento cutâneo marcado (necrose); d) Tela com o cálculo das áreas previamente marcadas.

Fonte: O autor, 2023.

2.8 Técnica de PCR Quantitativo em Tempo Real (qRT-PCR)

O RNA total foi extraído de um fragmento de pele de dorso de hamster utilizando-se o kit de colunas RNeasy Plus Mini (Qiagen – Hilden, Alemanha) de acordo com o protocolo do fabricante. As concentrações de RNA das amostras foram determinadas por espectrofotometria e a razão da absorbância 260nm/280nm usada para acessar a pureza das mesmas, aceitando-se razões como ótimas as que estivessem, aproximadamente, no valor de dois. O RNA total das amostras foi, então, utilizado para PCR em tempo real (qRT-PCR).

Para o qRT-PCR, foram desenhados primers específicos para HIF-1 alfa (Fator Indutor de Hipóxia 1 Alfa), VEGF, TNF-alfa (Fator de Necrose Tumoral Alfa) e Caspase 3 de hamster. Para controle interno, foram utilizados primers para Beta-actina. A transcrição reversa foi realizada com Kit Superscript III (Invitrogen) utilizando-se 1 micrograma de DNA total. Os DNAs complementares (DNAc) obtidos foram submetidos às reações em cadeia de polimerase com Quantifast SYBR green (Qiagen) em um termociclador do tipo 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). As condições para o qRT-PCR foram: 5 min a 95°C seguido de 40 ciclos de 10 s a 95°C e 30 s a 60°C. Os dados foram analisados no Software 7500 System, versão 2.05 (Applied Biosystems, Massachusetts, USA) e expressos através do método $2^{-DD^{CT}}$.

2.9 Método de Indução de Morte

A morte dos animais foi induzida com sobredose anestésica, usando a combinação Quetamina (75 mg/kg) e Xilasina (10 mg/kg) 0,5 ml/100 g via injeção intraperitoneal.

2.10 Análise Estatística

Os dados estão expressos como média e seu erro padrão da média. A diferença entre os grupos foi analisada através do teste t-Student, bicaudal, não pareado. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. As análises foram feitas com o programa GraphPad Prism, versão 9 para Windows (GraphPad Software, La Jolla California USA).

3. RESULTADOS

3.1 Descarte de Grupo por Perdas

Durante o desenvolvimento do estudo tivemos o seguimento de um grupo de modo insatisfatório:

Grupo 1- Grupo de análise da Velocidade de Infusão de CO₂: grupo onde foi feito a infusão prévia de CO₂ a 150 ml/min, evoluindo com perda de 2 amostras durante a indução anestésica. Não nos parece ter sido tal decesso por conta da quantidade de CO₂ (possível intoxicação por dióxido de carbono) infundido, por conta da maior velocidade de infusão, uma vez que a indução da anestesia se deu antes da infusão do gás daquele dia.

3.2 Resultados a partir da Análise Macroscópica

As seguintes representações apresentam a evolução da sobrevivência dos retalhos cutâneos no décimo quarto dia subsequentes ao procedimento cirúrgico de realização do retalho randomizado, com os percentuais relativos de necrose ao fim do estudo macroscópico.

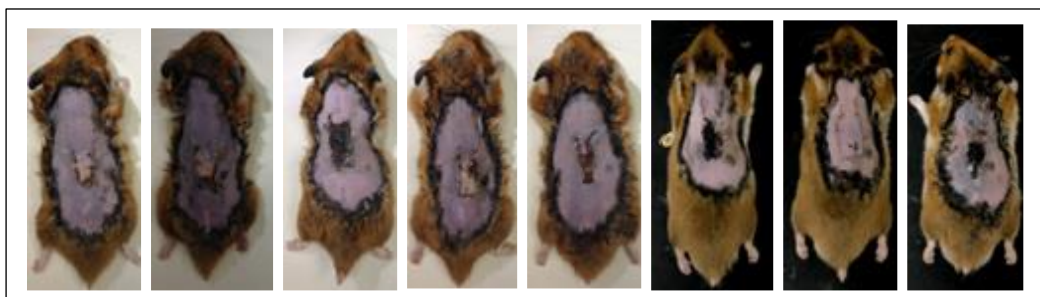
3.2.1 Grupo 1 - Grupo de análise da Velocidade de Infusão de CO₂

Utilizamos neste grupo a utilização de todos os volumes do aparelho Carboxiterapia e comparamos com o grupo controle (grupo não tratado), procedemos a investigação quanto a melhor velocidade de infusão no tratamento pré-cirúrgico, com o objetivo de isolar este vies. Todos utilizaram CO₂, pré cirúrgico com oito sessões, gás aquecido, plano intradérmico.

3.2.1.1 – Subgrupo Controle

As fotografias do subgrupo controle são apresentadas na figura 8. A média de necrose nos retalhos foi de $50,76\% \pm 9,29\%$.

Figura 8: Amostras do subgrupo controle no 14º dia após a realização do retalho

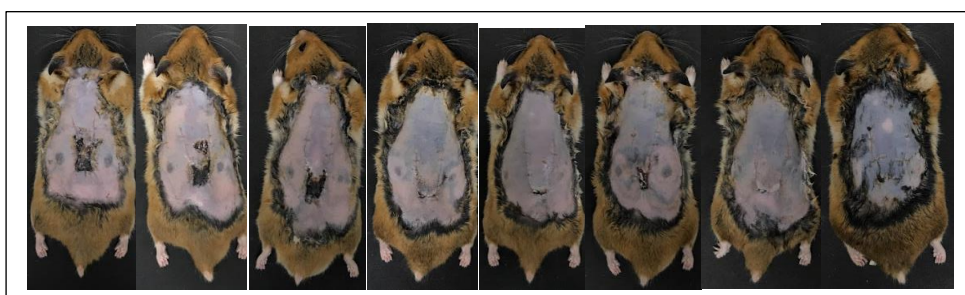


Fonte: O autor, 2023.

3.2.1.2 – Subgrupo 20 ml/min

As fotografias do subgrupo 20 ml/min são apresentadas na figura 9. A média de necrose nos retalhos foi de $21,16\% \pm 9,15\%$.

Figura 9: Amostras do subgrupo 20 ml/min no 14º dia após a realização do retalho

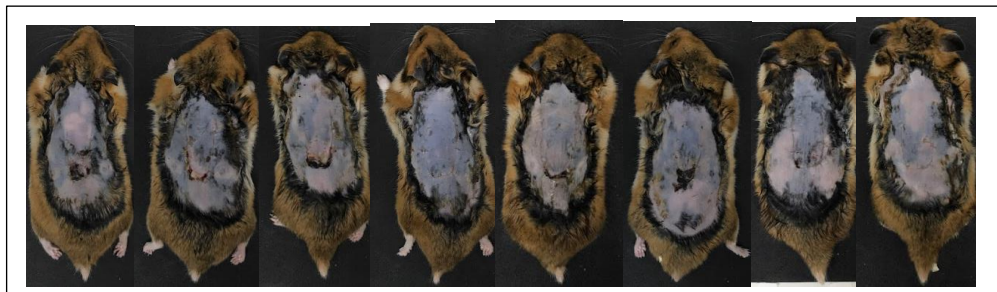


Fonte: O autor, 2023.

3.2.1.3 – Subgrupo 40 ml/min

As fotografias do subgrupo 40 ml/min são apresentadas na figura 10. A média de necrose nos retalhos foi de $11,29\% \pm 3,57\%$.

Figura 10: Amostras do subgrupo 40 ml/min no 14º dia após a realização do retalho.

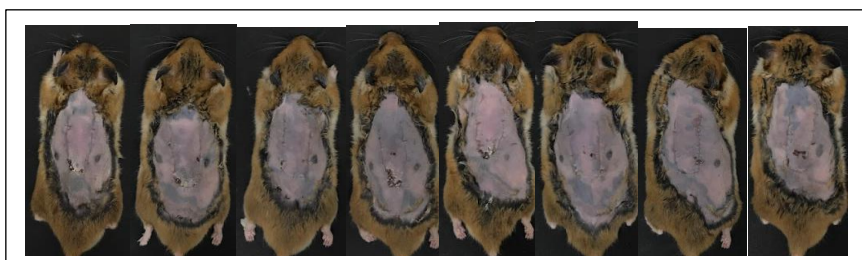


Fonte: O autor, 2023.

3.2.1.4 – Subgrupo 60 ml/min

As fotografias do subgrupo 60 ml/min são apresentadas na figura 11. A média de necrose nos retalhos foi de $4,93\% \pm 1,25\%$.

Figura 11: Amostras do subgrupo 60 ml/min no 14º dia após a realização do retalho.

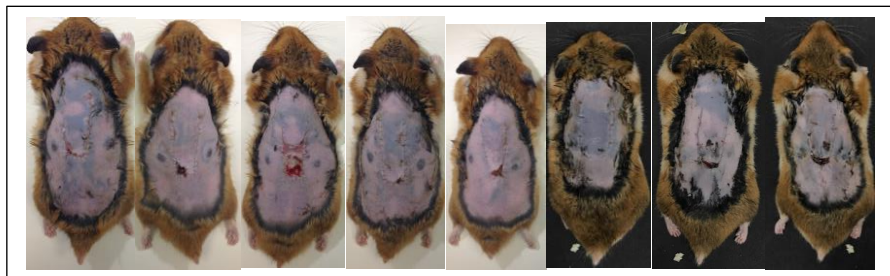


Fonte: O autor, 2023.

3.2.1.5 – Subgrupo 80 ml/min

As fotografias do subgrupo 80 ml/min são apresentadas na figura 12. A média de necrose nos retalhos foi de $7,49\% \pm 2,39\%$.

Figura 12: Amostras do subgrupo 80 ml/min no 14º dia após a realização do retalho.

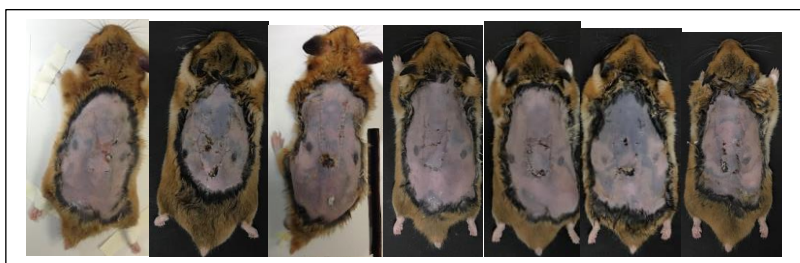


Fonte: O autor, 2023.

3.2.1.6 – Subgrupo 150 ml/min

As fotografias do subgrupo 150 ml/min são apresentadas na figura 13. A média de necrose nos retalhos foi de $8,37\% \pm 1,59\%$.

Figura 13: Amostras do subgrupo 150 ml/min no 14º dia após a realização do retalho.



Legenda: Grupo 150 ml/min com uma amostra a menos devido a 2 perdas.

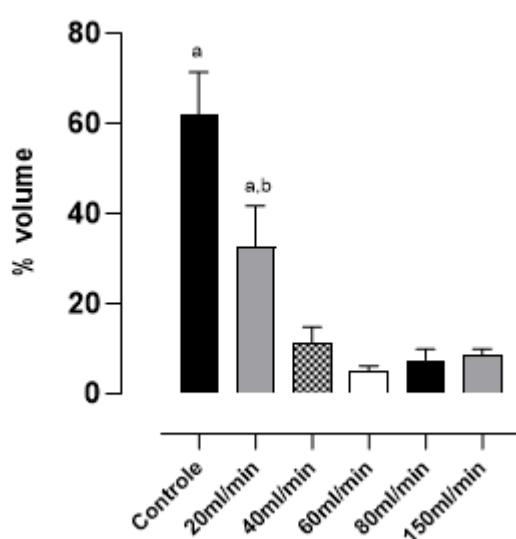
Fonte: O autor, 2023.

Após o cálculo das médias de áreas necrose nos retalhos, relacionadas aos seus tratamentos com CO₂ pré cirúrgicos nos respectivos volumes de infusão, obteve-se uma redução significativa na formação de tecidos desvitalizados. Todos os subgrupos tratados obtiveram diferença estatística significativa com o subgrupo controle. O subgrupo 20 ml/min obteve diferença estatística com o subgrupo controle e com os demais, exceto com o subgrupo 40ml/min. Os demais subgrupos (40 ml/min, 60 ml/min, 80 ml/min e 150ml/min) não obtiveram diferenças estatísticas significativas entre si (Figura 14). Deste modo citamos abaixo as diferenças estatísticas entre os grupo de volumes:

- a) Controle e 20ml/min: $p = 0,0057$

- b) Controle e os demais (40, 60, 80 e 150 ml/min): $p = 0,0001$
- c) 20 ml/min e 40 ml/min: sem diferença estatística
- d) 20 ml/min e 60 ml/min: $p = 0,0083$
- e) 20 ml/min e 80 ml/min: $p = 0,0819$
- f) 20 ml/min e 150 ml/min: $p = 0,029$

Figura 14: Gráfico relacionando dos resultados entre subgrupos de Volume (ml/min) x percentual de necrose.



Legenda: a = subcontrole com diferença estatística ($p < 0,05$) com demais subgrupos; b = subgrupo 20 ml/min com diferença estatística ($p < 0,05$) com todos subgrupos exceto subgrupo 40ml/min.
 Fonte: O autor, 2023.

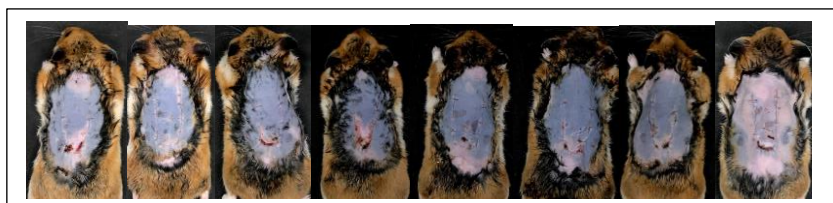
3.2.2 Grupo 2 - Grupo de análise da frequência de sessões de infusão de CO₂

Selecionado o subgrupo de velocidade de infusão de 60 ml/min, o qual obteve o melhor resultado em relação aos demais subgrupos tratados com o subgrupo controle; procedemos a investigação quanto a melhor frequência de sessões pré cirúrgicas. O subgrupo 60 ml/min havia sido tratado com 8 sessões. Procedemos a realização de mais 2 subgrupos similares alterando apenas a variável frequência de sessões pré cirúrgicas, com o objetivo de isolar mais este viés. Todos utilizaram CO₂ no volume 60 ml/min, gás aquecido, plano intradérmico.

3.2.2.1 – Subgrupo 1 sessão de CO₂

As fotografias do subgrupo uma sessão são apresentadas na figura 15. A média de necrose nos retalhos foi de $4,53\% \pm 1,25\%$.

Figura 15: Amostras do subgrupo uma sessão no 14º dia após a realização do retalho.

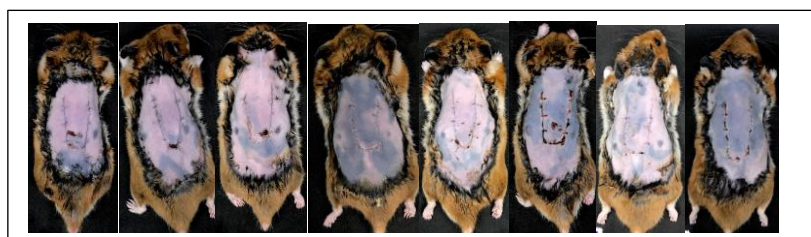


Fonte: O autor, 2023.

3.2.2.2 – Subgrupo 4 sessões de CO2

As fotografias do subgrupo quatro sessões são apresentadas na figura 16. A média de necrose nos retalhos foi de $1,86\% \pm 0,68\%$.

Figura 16: Amostras do subgrupo quatro sessões no 14º dia após a realização do retalho.



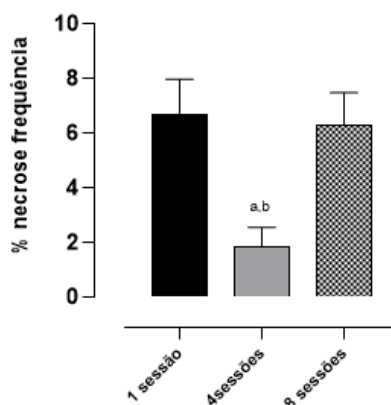
Fonte: O autor, 2023.

Após o cálculo das médias de áreas necrose nos retalhos, relacionadas aos seus tratamentos com CO₂ pré cirúrgicos com 60 ml/min, nas três frequências pré-determinadas (uma, quatro e oito), obteve-se mais uma redução significativa na formação de tecidos desvitalizados. O subgrupo de quatro sessões obteve diferença estatística significativa com os demais subgrupos de frequência. Os demais subgrupos (uma e oito sessões) não obtiveram diferenças estatísticas significativas entre si (Figura 17). Deste modo citamos abaixo as diferenças estatísticas entre os grupos de frequência de sessões:

- a) 1 e 4 sessões: $p = 0,0107$

- b) 1 e 8 sessões: sem diferença estatística considerável
 c) 4 e 8 sessões: $p = 0,0107$

Figura 17: Gráfico relacionando os resultados entre subgrupos de frequência x percentual de necrose.



Legenda: a = resultado do subgrupo 4 sessões com diferença estatística ($p < 0,05$) com o grupo 1 sessão; b = resultado do subgrupo 4 sessões com diferença estatística do subgrupo 8 sessões.
 Fonte: O autor, 2023.

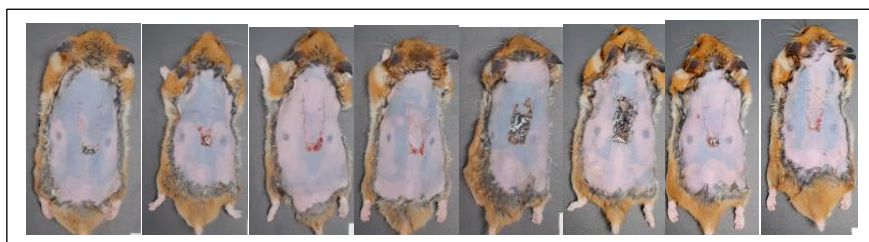
3.2.3 Grupo 3 - Grupo de análise do plano de infusão do CO₂

Selecionados os subgrupos de velocidade de infusão de 60 ml/min e de frequência de 4 sessão, os quais obtiveram os melhores resultados em relação aos demais subgrupos tratados com o subgrupo controle; procedemos a investigação quanto ao melhor plano de infusão em tratamento pré cirurgico. Procedemos a realização de mais 1 subgrupo similar alterando apenas a variavel plano de infusão, neste caso realizando a infusão no plano subcutâneo, com o objetivo de isolar mais este vies. Todos utilizarão CO₂ no volume 60 ml/min, 4 sessões e gás aquecido.

3.2.3.1 Subgrupo infusão subcutânea

As fotografias do subgrupo infusão subcutânea são apresentadas na figura 18. A média de necrose nos retalhos foi de $28,09\% \pm 1,30\%$.

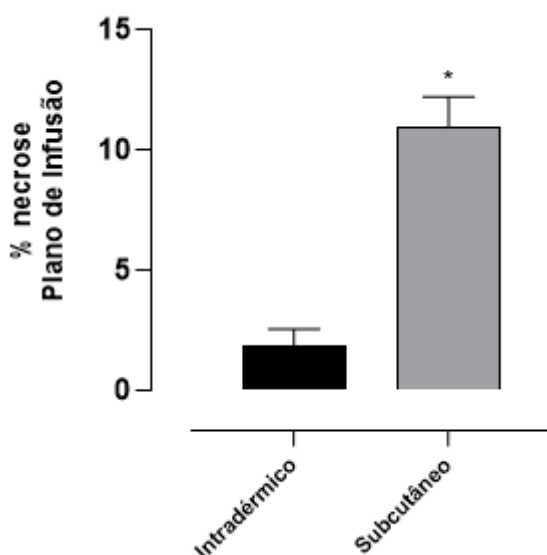
Figura 18: Amostras do subgrupo infusão subcutânea no 14º dia após a realização do retalho.



Fonte: O autor, 2023.

Após o cálculo das médias de áreas necrose nos retalhos, relacionadas aos seus tratamentos com CO₂ pré cirúrgicos com 60 ml/min com frequência de 4 sessões, comparando-se o plano de infusão intradérmico e subcutâneo, obteve-se uma diferença estatística significativa ($p = 0,0001$) do subgrupo intradérmico (melhor resultado) com o subgrupo subcutâneo. (Figura 19).

Figura 19: Gráfico relacionando dos resultados entre os subgrupos de infusão intradérmica e subcutânea com o percentual de necrose.



Legenda: * = diferença estatística ($p < 0,05$) entre os subgrupos subcutâneo e subdérmico.

Fonte: O autor, 2023.

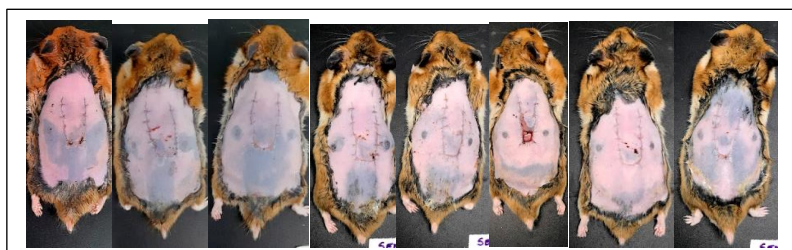
3.2.4 Grupo 4 - Grupo de análise da necessidade de aquecimento do CO₂

Selecionados os subgrupos de velocidade de infusão de 60 ml/min e de frequência de 4 sessões, com infusão intradérmica, os quais obtiveram os melhores resultados em relação aos demais subgrupos tratados com o subgrupo controle; procedemos a investigação quanto a necessidade (ou não) de aquecimento do CO₂ no tratamento pré cirúrgico. Procedemos a realização de mais 1 subgrupo similar alterando apenas a variável aquecimento, onde realizamos um subgrupo sem aquecimento, com o objetivo de isolar mais este viés. Todos utilizarão CO₂ no volume 60 ml/min, 4 sessões e plano de infusão intradérmico.

3.2.4.1 Subgrupo CO₂ sem aquecimento

As fotografias do subgrupo CO₂ sem aquecimento são apresentadas na figura 20. A média de necrose nos retalhos foi de $3,38\% \pm 1,82\%$.

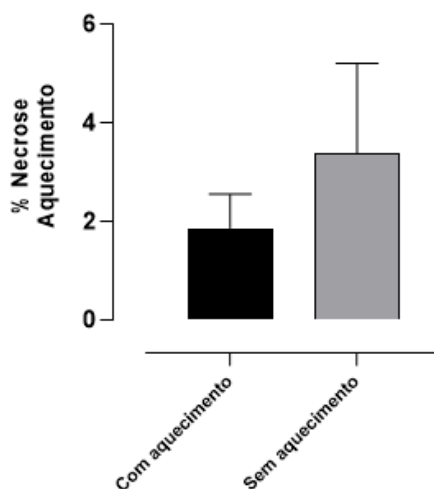
Figura 20: Amostras do subgrupo CO₂ não aquecido no 14º dia após a realização do retalho.



Fonte: O autor, 2023.

Após o cálculo das médias de áreas necrose nos retalhos, relacionadas aos seus tratamentos com CO₂ pré cirúrgicos com 60 ml/min com frequência de 4 sessões, intradérmico, comparando-se a necessidade ou não do aquecimento do gás, não obteve-se uma diferença estatística significativa do subgrupo aquecido (melhor resultado) com o subgrupo não aquecido. (Figura 21).

Figura 21: Gráfico relacionando dos resultados entre os subgrupos de infusão intradérmica e subcutânea com o percentual de necrose.



Fonte: O autor, 2023.

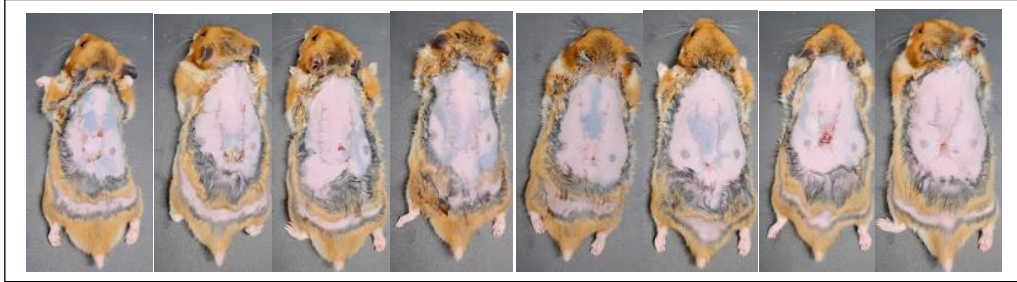
3.2.5 Grupo 5 – Grupo de análise quanto a comparação com gás inerte (Nitrogênio)

Selecionados os subgrupos de velocidade de infusão de 60 ml/min e de frequência de 4 sessões, com infusão intradérmica, e com aquecimento, os quais obtiveram os melhores resultados em relação aos demais subgrupos tratados com o subgrupo controle; procedemos a investigação quanto a necessidade de utilização gás CO₂ no tratamento pré cirúrgico. Procedemos a realização de mais 1 subgrupo similar alterando apenas a variável do gás CO₂, onde realizamos um subgruponno mesmo equipamento de infusão, com as mesmas variáveis, apenas trocando o gás pelo Nitrogênio (proposto como gás inerte), com o objetivo de isolar mais este vies. Todos utilizaram CO₂ no volume 60 ml/min, 4 sessões e plano de infusão intradérmico, aquecido.

3.2.5.1 Subgrupo com infusão de gás inerte (Nitrogênio)

As fotografias do subgrupo Gás inerte (nitrogênio) são apresentadas na figura 22. A média de necrose nos retalhos foi de $8,86\% \pm 3,91\%$.

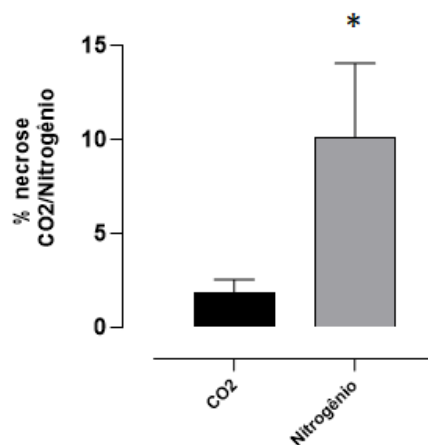
Figura 22: Amostras do subgrupo Gás inerte (nitrogênio) no 14º dia após a realização do retalho.



Fonte: O autor, 2023.

Após o cálculo das médias de áreas necrose nos retalhos, relacionadas ao seu tratamento com pré cirúrgicos com Nitrogênio 60 ml/min com frequência de 4 sessões, intradérmico e com aquecimento, para a constatação da a necessidade ou não do CO₂ como gás efetor da melhora da viabilidade cutânea. Obteve-se uma diferença estatística significativa ($p = 0,0443$) do subgrupo com CO₂ (melhor resultado) com o subgrupo Nitrogênio. (Figura 23).

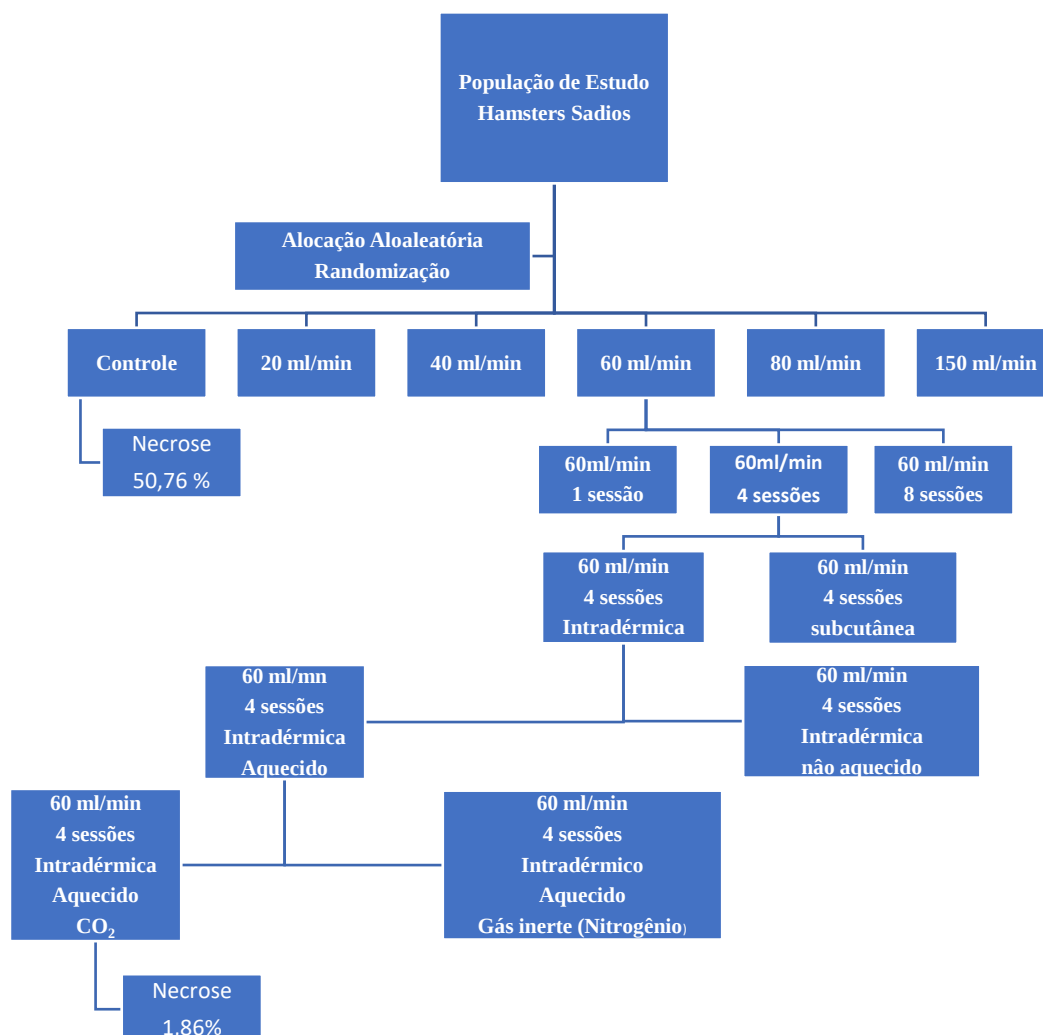
Figura 23: Gráfico relacionando dos resultados entre os subgrupos de infusão CO₂ com nitrogênio com o percentual de necrose.



Legenda: * = diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$)

Fonte: O autor, 2023.

Figura 24: Organograma demonstrando o desenho da pesquisa conforme resultados obtidos com a viabilidade cutânea (análise macroscópica).



Fonte: O autor, 2023.

3.3 Resultados a partir da Análise pela Técnica de PCR Quantitativo em Tempo Real (qRT-PCR)

Nesta análise procurou-se obter de modo quantitativo a expressão gênica, nos diversos cenários de estimulação já apresentados, dos seguintes marcadores:

- HIF-1 alfa (Fator Indutor de Hipóxia 1 Alfa);
- VEGF (Fator de Crescimento Endotelial Vascular);

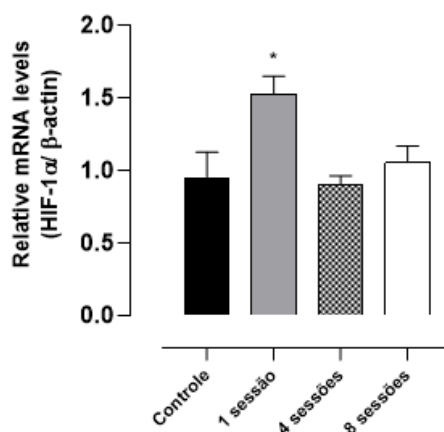
- c) TNF-alfa (Fator de Necrose Tumoral Alfa);
- d) Caspase 3

3.3.1 qRT-PCR para HIF-1 alfa

Obtivemos uma expressão gênica com diferença estatística para o HIF-1 alfa no subgrupo de uma sessão de infusão, em comparação com os demais subgrupos de frequência de sessões e com o controle. (Figura 25). Deste modo citamos abaixo as diferenças estatísticas entre os grupo de frequência de sessões:

- a) 1 sessão e 4 sessões: $p = 0,0074$
- b) 1 sessão e 8 sessões: $p = 0,0249$
- c) Controle e 1 sessão: $p = 0,00249$

Figura 25: Gráfico relacionando qRT-PCR para HIF-1 alfa do subgrupo controle com a das diversas frequências de sessões de infusão de CO₂.



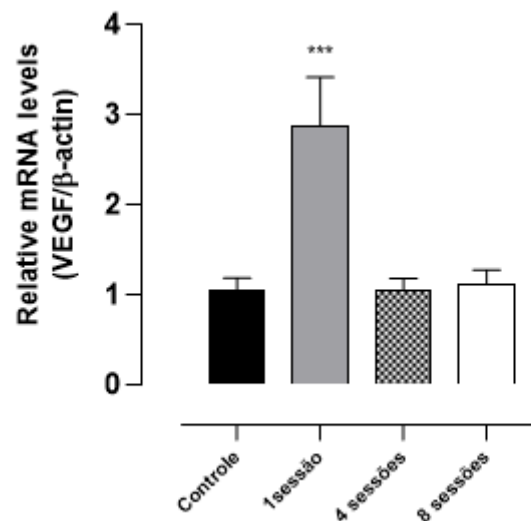
Legenda: * = Diferença estatística ($p < 0,05$) do subgrupo 1 sessão com os demais subgrupos.
Fonte: O autor, 2023.

3.3.2 qRT-PCR para VEGF

Obtivemos uma expressão gênica com diferença estatística para o VEGF no subgrupo de uma sessão de infusão, em comparação com os demais subgrupos de frequência de sessões e com o controle. (Figura 26). Deste modo citamos abaixo as diferenças estatísticas entre os grupo de frequência de sessões:

- a) 1 sessão e 4 sessões: $p = 0,0006$
- b) 1 sessão e 8 sessões: $p = 0,0006$
- c) Controle e 1 sessão: $p = 0,0006$

Figura 26: Gráfico relacionando qRT-PCR para VEGF do subgrupo controle com a das diversas frequências de sessões de infusão de CO₂.

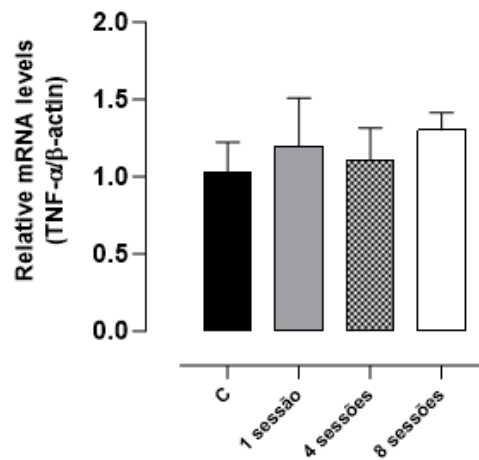


Legenda: * = diferença estatística ($p < 0,05$) do subgrupo 1 sessão para os demais subgrupos
 Fonte: O autor, 2023.

3.3.3 qRT-PCR para TNF-alfa

Não obtivemos uma expressão gênica com diferença estatística para o marcador TNF-alfa dentre os subgrupos de frequência de sessões de CO₂ e o subgrupo controle. (Figura 27).

Figura 27: Gráfico relacionando qRT-PCR para TNF-alfa do subgrupo controle com a das diversas frequências de sessões de infusão de CO₂.

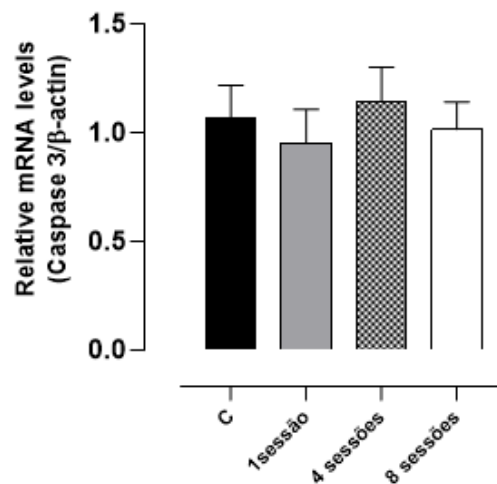


Fonte: O autor, 2023.

3.3.4 qRT-PCR para Caspase 3

Não obtivemos uma expressão gênica com diferença estatística para o marcador Caspase 3 dentre os subgrupos de frequência de sessões de CO₂ e o subgrupo controle. (Figura 28).

Figura 28: Gráfico relacionando qRT-PCR para Caspase 3 do subgrupo controle com a das diversas frequências de sessões de infusão de CO₂.



Fonte: O autor, 2023.

4. DISCUSSÃO

Este estudo nasce da afirmação de ser a hipóxia tecidual a maior fator estimulador de angiogênese. Molina e colaboradores (40) descrevem que tecidos sob situações hipóxia tendem a estimular expressão genética que permite a adaptação deste tecido à diminuição da oferta de oxigênio, sendo o HIF-1 alfa um fator que estimula esta adaptação de resposta à hipóxia. Este HIF-1 alfa seria capaz de regular uma complexa rede de receptores genéticos envolvidos na tanto na angiogênese, como na vasodilatação, eritropoiese e glicólise. Neste trabalho após submeter um tecido cerebral a um estímulo agudo hipobárico hipóxico o mesmo observou como resposta imediata a estimulação genética particularmente de HIF-1 alfa, sustentada até o quinto dia pós hipóxia. Do mesmo modo expressão gênica do VEGF também manifestou aumento considerável. O VEGF é um conhecido fator promotor de mitose endotelial e de permeabilidade vascular.

Krupinski e colaboradores (34) em seu trabalho a respeito de isquemia cerebral descreve que fatores angiogênicos analisados em seu trabalho aumentaram imediatamente após a isquemia, enquanto o aumento da rede de vasos apenas foi notada após 24 horas. Segundo os pesquisadores o hiato de tempo entre o estímulo e o aumento da vascularização do tecido se dá devido ao complexo processo de criação de novos vasos sanguíneos, que dependendo do tecido poderia durar de horas a dias para seu início. Porém a densidade dos vasos retorna a valores basais após o 5º dia. Outro autor, LaManna (35), descreve em seu trabalho que o retorno na densidade de vasos ao estado basal se dá após 7 dias.

Outro fator a ser considerado é o fenômeno isquemia-reperfusão que alguns tecidos sofrem após um período de isquemia, descrito por muitos autores como o maior componente de injúria (8). Tal pensamento se aplica se correlacionarmos que no trabalho de Coelho da Mota (14) que avalia um grupo controle sem tratamento quanto ao fluxo sanguíneo, medindo desde a base até a cessação do fluxo. Neste trabalho há aumento de fluxo sanguíneo ao logo do retalho (medido pelo Cytoscan) a partir de sua base, com diferença estatística já após 1 hora do procedimento cirúrgico, e após 24 horas; demonstrando que o simples ato do procedimento cirúrgico (causador de isquemia) promove um aumento de fluxo (vasomotor) já após uma hora do ato; porém infelizmente não há mudança na densidade capilar após 24 horas do trauma cirúrgico.

Os trabalhos alegam que mesmo que a expressão gênica aumente imediatamente após ao estímulo de hipóxia, a resposta tecidual pode demorar a responder, sendo notada apenas após

24 horas; e em nosso entendimento, mais de 24 horas para estimular neo vascularização, mesmo com estimulação de agentes farmacológicos das mais diversas origens, tem sido crucial para salvar um tecido isquêmico, na forma de retalhos randomizados.

Deste modo tendemos ao pesamento de que seria necessário um tratamento prévio ao procedimento cirúrgico, potencializando microcirculação (promoção de angiogênese e permeabilidade vascular), num tecido ainda sadio, sem limitações para melhoria de diversos fatores, como propusemos em nosso estudo. Serin e colaboradores (49) acreditam que o pré tratamento do retalho pode trazer resultados mais consistentes em relação ao aumento da sobrevivência tecidual.

Carmeliet e colaboradores (12) descrevem que as células endoteliais ao notarem o estado de hipóxia tecidual, induzem a liberação de fatores como HIF-1 alfa que permite que vasos reajustem seu diâmetro otimizando o fluxo sanguíneo. Deste modo não nos parecia cientificamente viável, visando melhora da viabilidade tecidual cutânea, a infusão do CO₂ no plano subcutâneo, como proposto por Negrão e colaboradores (31), plano tecidual conhecidamente pobre em volume vascular. Nesta linha de pensamento, obtivemos uma diferença estatística considerável no grupo intradérmico. A derme é a camada cutânea mais rica em vasos sanguíneos, que por serem providos de sensores de hipóxia, e, em se estando em contato com o CO₂ infundido, promove-se uma falsa hipóxia, por encontrar-se o tecido com alta densidade de CO₂, levando-se a uma cascata de reações de combate a isquemia. Em nosso estudo após a infusão de CO₂, em apenas 1 sessão obtemos expressão gênica de HIF1-alfa, em comparação ao grupo controle; cenário este que não repetiu no subgrupo de 4 e 8 sessões.

O retalho de dorso de ratos proposto por McFarlane (30) foi um divisor de águas numa tentativa de uniformizar a metodologia do estudo da microcirculação de retalhos randomizados. Utilizamos a técnica de McFarlane modificada por Camargo (11) por provocar maior área de necrose (alcançando 40% do retalho em ratos), tendo sido adaptada para hamsters mantendo suas proporções e região do pedículo, mostrando em nossa realidade uma média de necrose de 50,76%, colocando em prova a técnica utilizada.

Abramo (1) propõe em seu trabalho em úlceras de membros inferiores a aplicação do CO₂ no plano subcutâneo em intervalos de 72 horas em bordas da ferida, alcançando aumento do diâmetro das arteríolas pré capilares, aumento no número de capilares (entre a 3^o e a 10^o sessão). Em nossa abordagem intradérmica observamos que a difusão do gás durante a insuflação ultrapassava a área marcada, tratada como futuro retalho, atingindo a área de futura borda do retalho. Assim como exposto por Abramo, entendemos que esta proposta de aplicabilidade a cada 3 dias, proporcione melhora microcirculatória na área receptora e borda,

que proporciona melhor a adaptabilidade do retalho. Segundo estudos deste mesmo autor (3), esta periodicidade leva, entre outros aspectos a produção de proteínas, atividade vasomotora e quimiotaxia. Negrão (31) propõe também que a atividade vasomotora imediata do CO₂ promova um aumento do fluxo de nutrientes, como proteínas, necessárias para remodelação da matriz extracelular e reparo tecidual. Este autor também alega a falta de protocolo na literatura para angulação da agulha na aplicação do CO₂, profundidade de penetração da agulha e fluxo de infusão; deste modo sem comprovação de um protocolo que demonstre evidência científica de benefícios.

O CO₂ quando em comparação com o Nitrogênio provou não ser somente um fator de ação física no tecido, mas um promotor de alterações químicas, sendo vital para a proposta de melhora da média de necrose; o que não se repetiu, nos mesmos métodos com o Nitrogênio (gás inerte).

A respeito do tempo de observação pós cirúrgico para delinear a área necrosada seguimos os critérios propostos por Hurn e colaboradores (29) de 14 dias.

O CO₂ apresenta ação local, sem efeitos maiores sistêmicos, seguro em sua dose, hipoalergênico e de baixo custo. Sua segurança se expressa no seu baixo potencial de lesão tecidual e inflamação (este último aferido pelo RT-PCR), sem diferença estatística para o Fator de Necrose Tumoral (marcador inflamatório) e para Caspase 3 (apoptose). Notamos na aplicação da técnica que durante a infusão do gás, que volumes de infusão de menor velocidade se difundiam com maior dificuldade pelos tecidos (principalmente 20 e 40 ml/min) o que nos parece ter influenciado nos resultados.

Como proposta de novos estudos a respeito do tema, é sugerido a realização da técnica de Western Blotting no tecido cutâneo para estudar a expressão proteica tecidual sinalizada pela expressão gênica, além do estudo da ação do Oxido Nítrico agudamente.

Visualizamos no horizonte da ciência, com estudos complementares, sua aplicabilidade clínica em humanos, em uma etapa pré cirúrgica, em tecidos e retalhos conhecidamente de risco isquêmicos eminente, como por exemplo na tentativa de proporcionar o aumento de tecido a ser mobilizado em Cirurgias de Reconstrução Mamária utilizando-se o Retalho Miocutâneo Transverso do Reto-Abdominal.

Em nosso estudo propusemos um modelo de autonomização não cirurgica de retalhos randomizados, levando a um “entendimento tecidual” de isquemia controlada potencializando a microcirculação por estimular diversos fatores pró angiogenicos. Estipulou-se uma proposta analítica de diversos vieses, pelo critério de exclusão de grupos não satisfatórios em seus

resultados, num modelo experimental com hamsters, devido a sua dimensão de numerosos grupos e amostras.

A importância dos resultados se dá tanto pela dimensão dos resultados positivos relacionados à sobrevivência cutânea, quanto pela simplicidade, baixo custo, e acima de tudo, pela sua realização ser focada na área onde se deseja obter um aumento da eficiência circulatória local. Tal prática pode ser de grande valia na prática clínica da cirurgia reparadora.

CONCLUSÃO

O tratamento com CO₂ antes da realização do retalhos cutâneo randomizado em dorso de hamsters, na velocidade de 60 ml/min, em quatro sessões, no plano intradérmico aquecido, promove considerável sobrevivência de retalhos.

REFERÊNCIAS

- 1) Abramo AC, Teixeira TT. Carbon Insulfflations in Chronic Ulcers of the Lower Limbs. *Revista Brasileira de Cirurgia Plástica*, 2011. 26(2) 205-10.
- 2) Abramo AC, Teixeira TT, et al. Increase of skin Temperature After infusion – Controlled Carbon Dioxide. *Rev. Bras. Cir. Plástica*. 2009.24 (3)195-8.
- 3) Abramo AC. Infusão Controlada de CO²: carboinsulflação. 1 Ed. São Paulo: Câmara Brasileira do Livro, 2010.1-61.
- 4) Adamskaya N, Dungal P. Light therapy by blue LED improve wound healing in a excision model in rats. *International Journal of Care Injury*.2011.42.917-21.
- 5) Akan M, Çakir B. Effects of clopidogrel and high dose aspirin on survival of skin flaps in rats. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg*. 2005.39:7-10.
- 6) Baldan CS, Marques PA. The effects of different doses of 670nm diode laser on skin flap survival in rats. *Acta Cirúrgica Brasileira*.2012.27(2)155-61.
- 7) Bayat M, Chelcheraghi F. The effect of 30-day pretreatment with pentoxifylline on the survival of a random skin flap in the rat: an ultrastructural and biomechanical evaluation. *Med Sci Monit*. 2006.12:201-7.
- 8) Bekerecioglu M, Tercan M. The effect of Gingko Biloba extract as a free Radical scavenger on the survival of skin flaps in rats. *Scand J Plast Reconstr Hand Surgery*. 1998.32.135-9.
- 9) Brandi C, Grimaldi L. The role of Carbon Dioxide Therapy in the Treatment of Chronic Wounds. *In Vivo*. 2010.24:233-226.
- 10) Brockow T, Hausner T, Dillner A, Resch KL. Clinical evidence of subcutaneous CO₂ insufflations: a systematic review. *J Altern Complement Med*. 2000.6:391-403.
- 11) Camargo CP, Margarido NF. Description of a new experimental model skin flap for studying skin viability in rats. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 2014. 29(3)166-70.
- 12) Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*. 2011. 438:298-307.
- 13) Chen JX, Chiu CW. The effect of atorvastatin on survival of rat ischemic flap. *Kaohsiung Journal of Medical Sciences*.2013.29.187-93.
- 14) Coelho da Mota DS, Bouskela E et al. Effects of blufomedil and pentoxifylline on hamster skin flap microcirculation: prediction of flap viability using orthogonal polarization spectral imaging. *Clinics*. 2009; 64(8)797-802.
- 15) Costa CS, Otoshi JP, Cytometric Evaluation of Abdominal Subcutaneous Adipocytes After Percutaneous CO₂ Infiltration. *Revista Colégio Brasileiro Cirurgiões*, 2011. 38(1)15-22.
- 16) Durães EFR, Durães LC. The Effect of Carbon Dioxide Therapy on Composite Graft Survival. *Acta Cirurgica Brasileira*. 2011. 28(8)589-93.
- 17) Fayazzadeh E, Ahmadi, S.H. et al. A Comparative Study of Recombinant Human Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) and Erythropoietin (EPO) in Prevention of Skin Flap Ischemic Necrosis in Rats. *Archives of Iranian Medicine*. 2012.15(09)35-38.
- 18) Foster RE. CO₂: chemical, biochemical and physiological aspects. *Physiologist*. 1970;50:96-107.
- 19) Franco T, et al. *Princípios de Cirurgia Plástica*. 1 Ed. São Paulo. Editora Atheneu, 2002. 98.
- 20) Frederick FW, Sweeny L. Outcomes in head and neck reconstruction by surgical site and donor site. *Laryngoscope*. 2013.123(7)1612-7.

- 21) Gao W, Qiao X, et al. Adipose-Derived Stem Cells Accelerate Neovascularization in Schaemic Diabetic Skin Flap Via Expression of Hypoxia-Inducible Factor 1 α . *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2011.15 (12)2575-85.
- 22) Gemperli PC, Munhoz AM. The influence of type of vascular pedicle occlusion on the viability of skin island flaps. A postoperative quantitative assessment of flap survival in a experimental model in rats. *Acta Cir Bras*.2013.28(7)487-93.
- 23) Godoy GR, Liebano RE. Capsaicin on the viability of random-pattern skin flaps in rats.2010.25(5)440-43.
- 24) Grobahns A., Gensch H. CO₂-Gasinjektion-Indikation und Ergebnisse. *Z Gesamte Inn Med* 1987b.42(6)667-670.
- 25) Grobahns A. Erste Erfahrungen uber CO₂-Gas-Insufflationen. *Z arztl Fortbild* 1984.78:533-535
- 26) Haktanir NT, Yilmaz G. Effects of insulin-like growth factor-1 on randon pattern skin flap survival in rats.2016.31(8)513-19.
- 27) Heinicke HJ. Einfuhrende Mitteilung uber die therapeutische cubkutane Quellgasinsufflation mit Kohlendioxid. *Z Physiother* 1985.37:171-176.
- 28) Hembry PM. *British spas from 1815 to the present: a social history*. 1997; Edited and completed by Leonard W. Coiwe and Evelyn E. Cowie. London, Athlone Press.
- 29) Hurn IL, Fisher JC. Standardization of the dorsal rat flap model. *Annals of Plastic Surgery*. 1983.11(3):210-3
- 30) MCFarlane RM, DeYoung G. The design of a pedicle flap in the rat to study necrosis and its prevention.1965.36(2)177-82.
- 31) Negrão MMC, Ferreira LM. The effect of controled carbon dioxide insufflation on the viability of ischemic randon flaps in rats. *European Journal of Plastic Surgery*.2021.3(25)227-30.
- 32) Karaçal N, Ambarcioglu. Enhancement of dorsal randon-pattern skin flap survival in rats with topical lidocaine and prilocaine (EMLA): enhancement of flap survival by EMLA. *Journal of Surgical Research*.2004.124(1)134-38.
- 33) Kim T.K., Oh E.J., Chung J.Y., Park J.W., Cho B.C., Chung H.Y. The effects of botulinum toxin A on the survival of a random cutaneous flap. *J. Plast. Reconstr. Aesthetic Surg*. 2009.62:906–913.
- 34) Krupinski J, Kaluza J. Role of angiogenesis in patients with cerebral ischemic stroke. *Stroke*.1994.25.1794-98.
- 35) LaManna JC, Vendel LM. Brain adaptation to cronic hypobaric hypoxia in rats. *J. Appl Physiol*. 1992.72:2238-43.
- 36) Livaoglu M Kerimoglu S. The effect of hirudoid on randon Skin-flap survival in rats. *Journal of Plastic Reconst Aesthetic Surgery*. 2009. 63:1047-51.
- 37) Lebas D, Wiart T. Use of a romboid flap to repair temporal and frontotemporal cutaneous defects: 11 cases. *An Dermatol Venereal*, 2013.140:170-5.
- 38) Mélega JM. *Cirurgia Plástica Fundamentos e Arte. Princípios Gerais*. 2002. 1(12)107-120.
- 39) Milch H.S, Schubert SY et al. Enhancement of Ischemic Wound Healing by Inducement of local Angiogenesis. *Laryngoscope*. 2010.120:1744-48.
- 40) Molina F, Rus A. Short-Term hypoxia/reoxygenation actives tha angiogenic pathway in rat caudate putamen. *J Biosci*. 2013.38(2) 363-371.
- 41) Nakano M, Nakajima Y, et al. Effect of Autotransplantation of Microvessel Fragments on Experimental Randon-Patern Flaps in the Rat. *European Surgical Research*. 1998.30: 149-60.
- 42) Ozturk A, Firat C, et al. Beneficial Effects os Aminoguanidine on Skin Flap Survival in Diabetic Rats. *Experimental Diabetes Research*. 2012.14(8): 155-60.

- 43) Penhavel MVC, Nascimento VHT et al. Effects of Carbon Dioxide Therapy in the Healing of Acute Skin Wounds Induced on the Back of Rats. *Acta Cirurgica Brasileira*. 2013.8(5).
- 44) Philippe, C. Carboxytherapie: Une Nouvelle Technique Vieille de 80 ans. *Journal de L'AFMEaa*, 2008.
- 45) Richards L, Lineaweaver WC. Effect of hyperbaric oxygen therapy on the tubed pedicle flap survival in a rat model. *Annals of Plastic Surgery*.2003.50(1)51-6.
- 46) Reinich JF. The pathophysiology of skin flaps circulation. The delay phenomenon. *Plastic. Reconstruction Surgery*. 1974.50:585-90
- 47) Rohrich RJ Cherry GW. Enhancement of skin-flap Survival Using Nitroglycerin Ointment. 1984. *Plastic and Reconstructive Surgery*.1984.73(6)943-48.
- 48) Saito I, Hasegawa T. Effect of local application of transcutaneous carbon dioxide on survival of random-pattern skin flaps.*Journal of Plastic Reconstructive & Aesthetic Surgery*.2018.71:1644-51.
- 49) Serin N, Altinel D. Préoperative subcutaneous sildenafil injection increase random flap survival in rats. *Acta Cirurgica Brasileira*. 2018.33(3):216-22.
- 50) Shalon A, Hadad E, et al. Effect of Hyaluronic Acid on Random- Pattern Flaps in rats. *American Society for Dermatologic Surgery*. 2008.34:1212-15.
- 51) Stoller ML. Gas embolism: Helium is more lethal than carbon dioxide. *J Laparoendosc Surg* 1994.4:173-177.
- 52) Wolf JS, Carrier Grobans A., Gensch H. CO2-Gasinjektion-Indikation und Ergebnisse. *Z Gesamte Inn Med* 1987b; 42:667-70.
- 53) Zhou KL. Zhang YH. Effect of calcitriol on random skin flap survival in rats.*Nature*.2016.1-9.

ANEXO – Aprovação do Comitê de Ética



COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO
DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS (CEUA)

ibrag Instituto
de Biologia
Roberão
Alcantara
Gomes

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Estudo dos efeitos na microcirculação cutânea do uso do gás carbônico tópico medicinal", registrada com o nº 35/2016, sob a responsabilidade de **Eliete Bouskela** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS (CEUA) do Instituto de Biologia Roberão Alcantara Gomes da UERJ, em reunião de 26/07/2016.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	26/07/2020
Espécie/linhagem/raça	Hamster golden
Nº de animais	75
Peso/Idade	180 g / 23 dias
Sexo	Fêmea
Origem	Bioterio setorial

Rio de Janeiro, 26 de Julho de 2016.

Prof. Dr. Alex C. Manhães
Coordenador
CEUA/IBRAG/UERJ

Profa. Dra. Patricia C. Lisboa
Vice-Coordenadora
CEUA/IBRAG/UERJ