



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ – UFOPA  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO  
TECNOLÓGICA – PROPPIT  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS – PPG-Bio**

**BRENNO DE SOUSA FERREIRA**

**EFEITOS DA CARBOXITERAPIA NA CICATRIZAÇÃO DE  
FERIDAS CUTÂNEAS EM RATOS**

**Santarém-Pará**

**2019**

**BRENNO DE SOUSA FERREIRA**

**EFEITOS DA CARBOXITERAPIA NA CICATRIZAÇÃO DE  
FERIDAS CUTÂNEAS EM RATOS**

Dissertação de mestrado apresentado ao programa de pós-graduação em Biociências como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Biociências. Universidade Federal do Oeste do Pará; Área de concentração Fisiologia Ambiental.  
Orientadora: Dra. Adriana Caroprezio Morini

**Santarém-Pará**

**2019**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/UFOPA**

---

F383e      Ferreira, Brenno de Sousa  
              Efeito da carboxiterapia na cicatrização de feridas cutâneas em ratos / Brenno de  
              Sousa Ferreira. - Santarém, 2019.  
              49 f. : il., color.  
              Inclui bibliografias.

              Orientadora: Dra. Adriana Caroprezio Morini  
              Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Oeste do Pará, Programa de  
              Pós-graduação em Biociências.

              1. Carboxiterapia. 2. Cicatrização. 3. Feridas cutâneas. I. Morini, Adriana Caroprezio, orient. II. Título.

CDD: 23. ed. 615.19

---

**BRENNO DE SOUSA FERREIRA**

**EFEITOS DA CARBOXITERAPIA NA CICATRIZAÇÃO DE  
FERIDAS CUTÂNEAS EM RATOS**

Dissertação de mestrado apresentado ao programa de pós-graduação em Biociências como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Biociências. Universidade Federal do Oeste do Pará; Área de concentração Fisiologia Ambiental.

Orientadora: Dra. Adriana Caroprezo Morini

Data de aprovação: \_\_\_\_/ 07/ 2019

**BANCA EXAMINADORA:**

---

**Orientador (a):** Dra. Adriana Caroprezo Morini.

---

**Avaliador (a):**

---

**Avaliador (a):**

## **DEDICATÓRIA**

Dedico essa conquista a Deus por me iluminar todos os dias. A minha filha, Bruna Luísa, por quem caminho para deixar um bom legado. A minha mãe, Silvana Maria, e ao meu pai, João da Costa, pelo dom da vida e por todos esforços para me oferecer uma boa educação. A minha esposa, Francly Guedes, com quem compartilho as dificuldades e os momentos felizes de minha vida nos últimos 9 anos.

## AGRADECIMENTOS

Nesse momento de conquista, é muito bom ter gratidão as pessoas que nos ajudaram na vitória, em especial:

- Minha família: minha mãe, Silvana Maria de Sousa; meu pai, João da Costa Ferreira; minha esposa, Francilene Guedes Araújo; minha filha, Bruna Luísa Guedes Sousa; meus irmãos, Daniele de Sousa Ferreira, Floriano de Sousa Ferreira, Daniel de Sousa Ferreira e João da Costa Ferreira Filho; e todos os meus sobrinhos.

Por mais dedicado que eu seja na minha carreira profissional, minha família será meu diploma mais importante. Estar bem com minha família me ajuda a conquistar minhas vitórias pessoais.

- Minha esposa e fisioterapeuta, Francy Guedes, proprietária da Clínica Adventus, pela ajuda de conhecimento e por ceder os aparelhos para uso nessa pesquisa.

- Meu amigo e parceiro de pesquisa, Wanderson Fernandes Silva, com quem dividi os acertos e os erros desse estudo. Com ele divido essa vitória.

- A minha orientadora, Dra. Adriana Caroprezo Morini, primeiramente, por aceitar o convite. Segundo, por toda ajuda e dedicação para que essa pesquisa acontecesse.

- Ao professor, Juarez de Souza, por autorizar a realização do experimento e disponibilizar os animais do biotério do IESPES.

- Ao técnico do Biotério do IESPES, Railson, por toda ajuda na realização do experimento.

- Ao Instituto Esperança de Ensino Superior por ceder seu laboratório biotério.

- A Universidade Federal do Oeste do Pará por me oferecer a possibilidade de realizar um mestrado na minha região de nascimento.

## EPÍGRAFE

*“Aquilo que você pode sonhar, você pode realizar”*

Walt Disney

## RESUMO

Esta pesquisa teve como objetivo avaliar os efeitos da carboxiterapia, infusão no tecido subcutâneo de CO<sub>2</sub> medicinal, na cicatrização de lesões cutâneas em ratos Wistars. Trata-se de um estudo experimental e quantitativo, com uma amostra de 10 animais, divididos em grupo controle e grupo carboxiterapia. Todos os animais sofreram uma lesão com punch metálico de 5mm de diâmetro na região dorsal e, o grupo com terapia, tratado por 10 dias consecutivos e, em seguida, eutanasiado no 11º dia do experimento. A região foi fotografada em vários momentos da pesquisa para análise de evolução morfométrica da área da lesão e amostras de tecido contendo a lesão foram retiradas para análise microscópica. A análise histológica consistiu em verificar o depósito de colágeno, proliferação de fibroblastos e novos vasos sanguíneos. Os resultados da morfométricos mostraram que não houve aumento da velocidade de fechamento de área da lesão. O grupo tratado com carboxiterapia apresentou maior depósito de colágeno total, tipo I e tipo III e maior proliferação de fibroblastos comparado com o grupo controle, mas dados não estatisticamente significativos. Já a avaliação da formação de novos vasos sanguíneos teve um resultado positivo, com números estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ ). Ao final dessa pesquisa, conclui-se que a carboxiterapia pode ser uma boa opção de tratamento de feridas cutâneas, principalmente, em lesões com dificuldade de cicatrização devido ao déficit microcirculatório.

**Palavras-chave:** Carboxiterapia. Cicatrização. Feridas Cutâneas.

## ABSTRACT

This study aimed to evaluate the effects of carboxytherapy, infusion in the subcutaneous tissue of medicinal CO<sub>2</sub>, in the healing of cutaneous lesions in Wistar rats. This is an experimental and quantitative study, with a sample of 10 animals divided into a control group and a carboxytherapy group. All animals suffered a metallic punch injury of 5mm diameter in the dorsal region and the group with therapy treated for 10 consecutive days and then euthanized on the 11th day of the experiment. The region was photographed at various moments of the research to analyze the morphometric evolution of the lesion area and tissue samples containing the lesion were removed for microscopic analysis. . Histological analysis consisted of checking for collagen deposition, proliferation of fibroblasts and new blood vessels. The morphometric results showed that there was no increase in the velocity of closure of the lesion area. The carboxytherapy group presented higher total collagen deposition, type I and type III, and a greater proliferation of fibroblasts compared to the control group, but non-statistically significant data. The evaluation of the formation of new blood vessels had a positive result, with statistically significant numbers ( $p < 0.05$ ). At the end of this research, it was concluded that carboxytherapy may be a good treatment option for cutaneous wounds, especially in lesions with scarring due to microcirculatory deficit.

**Keywords:** Carboxytherapy. Healing. Skin Wounds.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 01.</b> Aparelho de carboxiterapia utilizado na pesquisa.	23
<b>Figura 02.</b> Utilização do <i>Software ImageJ</i> ®. Enquadramento da lesão e da régua de referência.	24
<b>Figura 03.</b> Utilização do <i>Software ImageJ</i> ®. Seleção da medida área.	24
<b>Figura 04.</b> Utilização do <i>Software ImageJ</i> ®. Delineamento da referência e calibração.	25
<b>Figura 05.</b> Utilização do <i>Software ImageJ</i> ®. Obtenção do resultado morfométrico da lesão.	25
<b>Figura 06.</b> Registro fotográfico utilizando Microscópio com câmera acoplada. Aumento de 400x.	27
<b>Figura 07.</b> Utilização do <i>Software ImageJ</i> ®. Abertura do <i>plug-in Threshold Colour</i> para análise de partículas automatizadas.	28
<b>Figura 08.</b> Utilização do <i>Software ImageJ</i> ®. Ajuste cor, saturação e brilho para colágeno tipo I.	28
<b>Figura 09.</b> Utilização do <i>Software ImageJ</i> ®. Solicitação dos resultados quantitativos.	29
<b>Figura 10.</b> Utilização do <i>Software ImageJ</i> ®. Aba com resultado de percentual de área de colágeno	29
<b>Figura 11.</b> Utilização do <i>Software ImageJ</i> ®. Ajuste cor, saturação e brilho para colágeno tipo III.	30
<b>Figura 12.</b> Utilização do <i>Software ImageJ</i> ®. Contagem de fibroblastos com o auxílio da ferramenta <i>Multi-point</i> .	30
<b>Figura 13.</b> Imagens das feridas dos ratos Wistar no 1º, 3º, 7º e 11º de experimento.	33
<b>Figura 14.</b> Avaliação histológica após 11 dias de experimento, no grupo controle e carboxiterapia, aumento de 400x	34

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 01.** Área em centímetros quadrados das feridas em ratos Wistar no 1º, 3º, 7º e 11º de experimento. 32
- Tabela 02.** Percentil de área média de colágeno tipo I e III dos grupos controle e carboxiterapia. 35
- Tabela 03.** Números de fibroblastos e vasos sanguíneos nos grupos controle e carboxiterapia. 36

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 01.** Correlação entre os tamanhos das áreas dos grupos dessa pesquisa, pelo Teste t de Student 32
- Gráfico 02.** Comparação entre as porcentagens médias de colágeno total, tipo I e tipo III, nos grupos controle e carboxiterapia. 35
- Gráfico 03.** Comparação entre o número total de fibroblastos nos grupos controle e carboxiterapia, no 11º de experimento. 36
- Gráfico 04.** Comparação entre os grupos controle e carboxiterapia, quanto ao número de vasos sanguíneos. 37

## SUMÁRIO

1.	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	13
2.	<b>OBJETIVOS.....</b>	15
2.1.	<b>Geral.....</b>	15
2.2.	<b>Específicos.....</b>	15
3.	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....</b>	16
3.1.	<b>Cicatrização de Feridas Cutâneas .....</b>	16
2.2.	<b>Carboxiterapia.....</b>	17
4.	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	20
4.1.	<b>Tipo de Estudo .....</b>	20
4.2.	<b>Local e Período.....</b>	20
4.3.	<b>Princípios Éticos da Pesquisa.....</b>	20
4.4.	<b>Amostra.....</b>	20
4.5.	<b>Grupos da Pesquisa .....</b>	21
4.6.	<b>Experimento .....</b>	22
4.6.1.	Anestesia.....	22
4.6.2.	Produção da Lesão .....	22
4.6.3.	Eutanásia.....	22
4.6.4.	Aplicação da Carboxiterapia .....	22
4.7.	<b>Métodos de Análise .....</b>	23
4.7.1.	Análise Fotogramétrica .....	23
4.7.2.	Análise Histopatológica .....	26
4.7.2.1.	Preparação das lâminas histológicas .....	26
4.7.2.2.	Registro fotográfico das lâminas em Microscópio.....	26
4.7.2.3.	Avaliação de Colágeno no <i>Software ImageJ®</i> .....	27
4.7.2.4.	Avaliação de Fibroblastos e Vasos Sanguíneos no <i>Software ImageJ®</i> .....	30
4.8.	<b>Tratamento Estatístico .....</b>	31
5.	<b>RESULTADOS .....</b>	32
6.	<b>DISCUSSÃO .....</b>	38

7.	<b>CONCLUSÃO .....</b>	42
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	43
	<b>APÊNDICE .....</b>	48
	<b>ANEXO .....</b>	49

## 1. INTRODUÇÃO

As feridas ocorrem por uma perda da continuidade e da integridade cutânea. O processo de cicatrização de feridas é dinâmico e complexo, depende da organização de células, matriz extracelular e sinais químicos, que variam no tempo e em sua sequência, para poder reparar o tecido lesionado. Muitas patologias acabam por dificultar esse processo, um grande exemplo, é o caso das úlceras de pés diabéticos (MENDONÇA, COUTINHO-NETTO, 2009; BRASILEIRO FILHO, 2017). Estas têm tratamento prolongado e difícil, muitas vezes, responsáveis por significativos índices de morbidade e mortalidade. Por isso, a importância de estudos de tratamentos que busquem o fechamento rápido da lesão de forma a se obter cicatriz funcional e esteticamente satisfatória (BRASILEIRO FILHO, 2017).

A medicina, apesar de toda evolução científica, ainda tem o desafio do tratamento de muitos tipos de feridas. Com isso, o estudo de terapias alternativas e mais modernas que combatam as lesões de difícil cicatrização constituem um vasto campo de pesquisa a ser explorado no ramo da reabilitação. Nesse sentido, o emprego da carboxiterapia no tratamento dessas lesões contextualizam um panorama positivo (BRANDI et al., 2010; PIAZZOLLA, 2011).

Essa técnica consiste em administrar terapêuticamente gás carbônico medicinal (CO<sub>2</sub>) através de injeção hipodérmica no tecido subcutâneo diretamente nas áreas afetadas com objetivos de melhorar a microcirculação e, conseqüentemente, a oxigenação tecidual (LOBO et al., 2005; CARVALHO et al., 2005; GOLDMAN et al., 2006; WORTHINGTON, LOPEZ, 2006; LEE, 2010). Vale ressaltar, que nestes experimentos, foram relatados um reduzido número de reações adversas, portanto, um tratamento com bons resultados, alcançados de forma segura.

O levantamento bibliográfico revelou, porém, um reduzido número de estudos voltados para aplicação da carboxiterapia no tratamento de reparo tecidual (BRANDI et al., 2010; PIAZZOLLA, 2011, MORALES, 2008), enquanto há um crescente número de estudos direcionados para o seu uso em tratamentos estéticos (GOLDMAN et al, 2006; BRANDI et al, 2004; CORRÊA et al, 2008; FERREIRA et al, 2008; CARVALHO et al, 2005). Percebe-se necessidade a realização de mais estudos para analisar os resultados da aplicação dessa terapia no reparo tecidual.

Essa temática justificou-se, portanto, pela possibilidade de oferecer respaldo científico para aplicação de carboxiterapia, com grande potencial para alcançar bons resultados, com

o mínimo de efeitos adversos, para um acometimento frequente que são as lesões crônicas, bastante resistentes às terapêuticas atuais e de grande repercussão funcional para o paciente, podendo, recomendar a carboxiterapia como métodos que podem ser somados ao arsenal de técnicas para o combate de lesões de difícil cicatrização.

Com base no exposto, esse estudo analisou a hipótese de que a carboxiterapia potencialize o processo de reparo tecidual. E teve como objetivos avaliar a evolução macroscópica e os efeitos microscópicos do tratamento na cicatrização de úlceras cutâneas.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Geral**

- Avaliar os efeitos da carboxiterapia no processo de cicatrização cutânea de ferida em ratos Wistars sadios.

### **2.2. Específicos**

- Observar a evolução macroscópica da área das lesões dos ratos saudáveis tratados com carboxiterapia;

- Avaliar os efeitos do gás carbônico na estimulação do depósito de colágeno nas feridas de ratos saudáveis;

- Avaliar os efeitos da carboxiterapia na proliferação de fibroblastos no local da lesão dos ratos;

- Avaliar a neovascularização das lesões cutâneas dos ratos tratados com carboxiterapia.

### 3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1. Cicatrização de Feridas Cutâneas

O processo de cicatrização e reparo tecidual consiste na reconstrução do tecido lesionado mediado pelo sistema imunológico cuja finalidade é restabelecer a morfologia e a função local o mais próximo possível da normalidade (KUMAR et al., 2013), trata-se de um processo extremamente complexo que envolve sinais químicos, alterações vasomotoras, depósito de proteínas e remodelagem da matriz extracelular (MENDONÇA, COUTINHO-NETTO, 2009).

A cicatrização envolve 3 estágios principais: inflamação, proliferação e remodelação. Essas etapas não ocorrem em momentos definidos e diferentes, mas associados entre si (ISAAC et al., 2010; KUMAR et al., 2013; BRASILEIRO FILHO, 2017).

A etapa inflamatória ocorre logo após a lesão e representa a resposta imediata do corpo ao estímulo nocivo. No momento da ocorrência da lesão ocorre vasoconstrição reflexa que promove hipóxia tecidual, logo em seguida o vaso sanguíneo dilata aumentando o aporte de sangue trazendo consigo células do sistema imunitário. Além das células imunitárias são liberadas no local substâncias quimiotáticas que estimulam ainda mais a resposta inflamatória (BRASILEIRO FILHO, 2017). O extravasamento de líquidos e células imunitárias no local da lesão caracteriza o exsudato inflamatório e tem como função remover as células mortas e microrganismos preparando o local para a reconstituição celular. Devido a vasodilatação e fatores associados, a inflamação, primeira etapa da cicatrização, é bem caracterizado pela presença de edema, vermelhidão, calor, dor e perda funcional (ISAAC et al., 2010; KUMAR et al., 2013).

A segunda etapa do processo de cicatrização, estágio migratório e proliferativo, acontece simultaneamente ao processo inflamatório e é caracterizado por formação de novos vasos sanguíneos, angiogênese, e tecido de granulação. Células especializadas na síntese de colágeno, fibroblastos, aumentam em número e apresentam-se metabolicamente ativo depositando matriz extracelular. Nessa etapa o tecido lesionado apresenta uma certa resistência a tração ou novas lesões (CAMPOS et al., 2007; PAGGIARO, 2010).

Conforme os macrófagos e outras células removem o tecido necrótico a nova matriz de colágeno e outras proteínas ocupam o local da lesão promovendo seu fechamento. A moderada resistência oferecida pelo colágeno depositado favorece a integridade dos novos vasos formados oferecendo aspecto granular ao tecido. No final desse processo a lesão está

completamente fechada e o tecido é predominantemente acelular abundante de proteínas da matriz (ISAAC et al., 2010; BRASILEIRO FILHO, 2017).

A etapa final do processo de cicatrização, remodelação, caracteriza-se por substituição do tecido formado na fase de migração por um tecido cicatricial altamente resistente a nova lesão. A remodelação da matriz é executada por fibroblastos que depositam colágeno de forma mais ordenada as linhas de formação promovendo maior resistência ao tecido. Nessa fase a cicatriz sofre contração e células epiteliais migram para as bordas da cicatriz multiplicando-se até que as margens opostas se encontrem (TAZIMA et al., 2008; KUMAR et al., 2013).

### **3.2. Carboxiterapia**

A técnica é definida como a administração terapêutica do anidrido carbônico (também denominado gás carbônico ou CO<sub>2</sub>) através de injeção hipodérmica no tecido subcutâneo diretamente nas áreas afetadas com objetivos terapêuticos como melhora da circulação e oxigenação tecidual (LEE, 2010; CARVALHO et al., 2005; GOLDMAN et al., 2006; WORTHINGTON; LOPEZ, 2006).

A administração do CO<sub>2</sub> pela via subcutânea tornou-se terapêutica frequente na Europa desde os anos 30, principalmente na Itália e na França, sendo inicialmente utilizada para o tratamento de arteriopatias obliterantes (PARASSONI, VARLARO, 1997; BRANDI et al., 2001; BRANDI et al., 2004; CORRÊA et al., 2008).

Os princípios fisiológicos da aplicação terapêutica de gás carbônico nos tecidos podem ser explicados como: ao injetar CO<sub>2</sub> no tecido subcutâneo este serve de estímulo para que imediatamente haja uma vasodilatação local, e conseqüentemente um maior aporte sanguíneo na área tratada, fazendo com que os eritrócitos capturem o CO<sub>2</sub> presente nos tecidos e liberem o O<sub>2</sub> (alteração da curva de dissociação da hemoglobina), oxigenando o tecido, enquanto o excesso de CO<sub>2</sub> é eliminado ao nível pulmonar. Percebe-se, portanto, que os efeitos da aplicação de CO<sub>2</sub> ocorrem, sobretudo, na microcirculação (LEE, 2010; SCORZA, BORGES, 2008; MORALES, 2008).

Existem também outros efeitos, como o aumento da drenagem veno-linfática, a melhora do fluxo de nutrientes (dentre eles estão as proteinases necessárias para remodelar os componentes da matriz extracelular e para acomodar a migração e reparação tecidual), angiogênese, estimulação da formação de fibras colágenas e elásticas, melhora do tônus e da

elasticidade da pele (MORALES, 2008; CORRÊA et al., 2008; PARASSONI, VARLARO, 1997; BRANDI et al., 2001; BRANDI et al., 2004; SCORZA; BORGES, 2008).

Outro mecanismo de atuação inclui o rompimento da membrana adipocitária, que associada à alteração na curva de dissociação da hemoglobina com o oxigênio (já comentada), promove uma contundente ação lipolítica oxidativa (LEE, 2010; SCORZA; BORGES, 2008; CORRÊA et al., 2008; BRANDI et al., 2001).

É importante destacar que a carboxiterapia é mencionada por diversos autores (GOÉS, 2005; BRANDI et al., 2001; MORALES, 2008; CORRÊA, 2008), como sendo uma técnica segura, sem importantes reações adversas descritas e sem grandes contraindicações.

Isto se justifica devido o gás carbônico ser um metabólico presente na circulação sanguínea, e devido à quantidade de gás injetado durante o tratamento está abaixo do volume produzido pelo organismo, não tendo sido descrita até a presente data nenhum dano ao tecido conjuntivo, vascular ou estrutura nervosa dos pacientes que já fizeram seu uso (BRANDI et al., 2001; SCORZA; BORGES, 2008).

Em relação à embolia estudos com a utilização de injeções intravasculares de até 100ml e fluxos contínuos entre 20 e 30ml/segundo, acompanhados de angiografia em contraste, já foram realizados demonstrando que o dióxido de carbono não acarretou esta complicação (TORYAMA et al., 2002; ZWAAN et al., 1996; LANG et al., 1999).

Os efeitos adversos já descritos na literatura científica para a aplicação terapêutica de gás carbônico subcutâneo, limitam-se a dor no local da aplicação; sensação de aumento de temperatura local; hiperemias, hematomas ou equimoses devido às punturas e sensação de crepitação devido à formação de um enfisema local. Todos estes efeitos, porém, são descritos como transitórios, abolindo-se em no máximo 30 minutos (SCORZA; BORGES, 2008; CARVALHO et al., 2005; GOLDMAN et al., 2006).

Entre as contraindicações já descritas observa-se: infarto agudo do miocárdio, angina instável, insuficiência cardíaca, hipertensão arterial, tromboflebite aguda, gangrena, infecções localizadas, epilepsia, insuficiência respiratória, insuficiência renal, gravidez e distúrbios psiquiátricos (GOLDMAN et al., 2006; BROCKOW et al., 2000).

Por todos os seus efeitos e pela sua baixa capacidade de produzir danos aos tecidos humanos, o uso do gás carbônico já é bastante conhecido e aceito na área da saúde, sendo atualmente amplamente empregado como um recurso para tratamentos estéticos, como no tratamento do fibroedema gelóide (celulite) (GOLDMAN et al., 2006; BRANDI et al., 2001; FRANCESCO et al., 1998; CORRÊA et al., 2008), rugas (FERREIRA et al., 2008), flacidez

cutânea (WORTHINGTON; LOPEZ, 2006; CARVALHO et al., 2005; BRANDI et al., 2001) e como terapia complementar pós-lipoaspiração (BRANDI et al., 2004).

Contudo a aplicação terapêutica do gás carbônico subcutâneo também é indicada, e já possui evidências de seus benefícios, em diversas outras condições patológicas: arteriopatias periféricas (AMBROSI; DELANOE, 2005; FABRY et al., 1995), ulcerações em membros inferiores (MORALES, 2008; WOLLINA et al., 2004), psoríase (GULIAEVA et al., 1999) e pacientes portadores do fenômeno de Raynaud (SCHMIDT et al., 2005), por exemplo. De uma maneira geral pode-se, portanto, considerar que a indicação da carboxiterapia está voltada para patologias que se beneficiam com o incremento da microcirculação tecidual (SCORZA; BORGES, 2008).

Em seu estudo, Brandi et al. (2010) estudaram 70 pacientes com úlceras crônicas de etiologia traumática, venosa e arterial, divididos em dois grupos: um grupo realizando tratamento com aplicação de carboxiterapia subcutânea e curativos habituais, e o outro grupo se valendo apenas da aplicação de curativos. Os resultados mostraram cicatrização em 71% das úlceras tratadas com carboxiterapia, resultado superior aos 51% das úlceras tratadas apenas com curativos. Em outro estudo, Piazzolla (2011) realizou carboxiterapia em 39 úlceras vasculares e os resultados mostraram cicatrização completa de 38,5% e melhora da cicatrização e redução da dor em todas as úlceras.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Tipo de Estudo**

Esse trabalho foi realizado através de pesquisa experimental, por meio de estudo quantitativo, observando-se o comportamento de uma amostra específica, durante intervalo de tempo definido. De acordo com as premissas, esse estudo científico pode ser assim classificado:

- Natureza: quantitativa, uma vez que trabalhará com dados quantificáveis, requerendo o uso de recursos e de técnicas estatísticas;
- Objetivo: explicativa, pois identificar os fatores que determinarão à ocorrência dos fenômenos estudados;
- Procedimento: como do tipo experimental, já que as variáveis que podem interferir sobre o fenômeno estudado serão controladas com intuito de observar as modificações ocorridas no objeto de estudo.

### **4.2. Local e Período**

O desenvolvimento da pesquisa experimental ocorreu no Biotério do Instituto Esperança de Ensino Superior (IESPES) em Santarém e o registro fotográfico das lâminas ocorreu no laboratório da Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA).

O período de realização da pesquisa foi entre janeiro de 2018 a junho de 2019.

### **4.3. Princípios Éticos da Pesquisa**

Todos os animais foram manejados segundo as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e legislação nacional para vivissecção animal em vigor (Lei federal 6.638 de 08 de maio de 1979), que define normas para a realização de pesquisas com animais de laboratório, e da lei n. 9605/98 que versa sobre crimes ambientais.

Esse estudo foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais da UFOPA protocolo n° 10014-2017, e devidamente aprovado (ANEXO I).

### **4.4. Amostra**

Para essa pesquisa foram utilizados 10 ratos da linhagem Wistar, todos machos, adultos, sadios, com idade superior a 90 (noventa) dias e peso entre 250 (duzentos e cinquenta) e 300 (trezentos) gramas. Esses animais foram escolhidos devido as suas várias vantagens: são de fácil manuseio, ocupam pequenos espaços, têm elevada resistência à

infecção e apresentam semelhanças clínicas, laboratoriais e histopatológicas com os humanos. Além disso, devido a essas vantagens, possibilitam trabalhar simultaneamente com vários grupos e subgrupos experimentais.

Durante o período da pesquisa, os ratos foram mantidos em gaiolas apropriadas de polipropileno com medidas de 41cmx34cmx16cm, forradas com maravalha, acomodando 5 (cinco) animais em cada um desses microambientes. Esses animais foram observados durante um período mínimo de 15 (quinze) dias antes do início do estudo propriamente dito. O objetivo desse período foi promover a melhor adaptação ao ambiente do laboratório, seguindo as diretrizes do COBEA (2006), que define esse como período mínimo de pré-observação dos animais antes de qualquer estudo científico.

Vale ressaltar que o laboratório de experimentação teve acesso restrito aos autores dessa pesquisa e demais membros do laboratório, apresentando condições ambientais controladas (12 horas de ciclo claro/escuro; ambiente higienizado; temperatura de  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$  e ventilação adequada), além da oferta de alimento e água ad libitum aos animais durante todo o experimento.

#### **4.5. Grupos da Pesquisa**

Para essa pesquisa os animais foram separados em 2 (dois) grupos quanto ao tipo de tratamento, compostos por 5 (cinco) animais cada. Esses grupos foram assim compostos:

1 - Grupo GC (Grupo Controle - recebeu a lesão, entretanto, sem nenhum tratamento).

2 - Grupo GCa (Grupo Carboxiterapia – recebeu a lesão e foi tratado com carboxiterapia).

Os grupos dessa pesquisa sofreram eutanásia no 11º dia após a lesão, conforme os estudos de Silva (2010) e Cunha (2008). Nestas pesquisas, também foram realizadas 10 sessões de tratamento consecutivos, no caso, laser de baixa potência, e, no dia seguinte a última sessão, ocorria a eutanásia. Paulo (2016) avaliou os efeitos da carboxiterapia em ratos e também utilizou o 11º dia para eutanásia.

Além disso, o motivo dessa escolha consiste no fato de, geralmente, o número de sessões de fisioterapia prescritas pelos profissionais médicos é em torno de 10 sessões. A partir dessa rotina, pretendeu-se aproximar essa pesquisa aos tratamentos realizados no cotidiano da prática profissional.

## 4.6. Experimento

### 4.6.1. Anestesia

A técnica de indução anestésica empregada foi o método de injeção intraperitoneal de Ketamina 10% (0,10ml/100g), droga anestésica geral, e Xilazina 2% (0,25 ml/100mg), substância com propriedades sedativas, analgésica e relaxante muscular.

### 4.6.2. Produção da Lesão

Após anestesia, todos os animais foram submetidos a lesões traumáticas padronizadas. O procedimento foi iniciado com a tricotomia manual e antissepsia com povidine-iodine (PVPI). A seguir, o animal foi posicionado em decúbito ventral com os quatro membros estendidos e a cabeça alinhada ao tronco. Então, foi realizado 1 (uma) ferida excisional circular. Para isso, foi utilizado um punch metálico de 5mm com lâmina cortante na sua borda inferior. Em seguida, a retirada de fragmento cutâneo até a exposição da fáscia muscular dorsal.

### 4.6.3. Eutanásia

A eutanásia consistiu na aplicação da dose dobrada de xilazina 2% e ketamina 10%. Após o óbito dos animais, era retirada uma amostra de tecido, com bisturi, incluindo a área da lesão tratada. A tira de pele era aberta em uma placa quadrada de EVA (Espuma Vinílica Acetinada) e fixada com ajuda de alfinetes. Logo em seguida, o tecido era armazenado em um pote pequeno com Formol a 10% para posterior confecção das lâminas histológicas.

### 4.6.4. Aplicação da Carboxiterapia

Após a ocorrência da lesão, os animais iniciaram as sessões de terapia diárias com duração aproximada de 5 minutos/cada, por dez dias consecutivos. A aplicação da carboxiterapia foi realizada em 4 pontos, com distância aproximada de 0,5cm da borda da ferida, formando um quadrado ao redor da lesão. A administração do gás carbônico foi realizada através de agulhas 30G, introduzidas com angulação de aproximada de 30° em relação à pele, com a ponta da agulha em direção ao centro da lesão. Essa agulha é conectada ao aparelho de carboxiterapia. Nessa pesquisa, o modelo de aparelho de carboxiterapia foi o Ares produzido pela empresa Ibramed® (Figura 01). O fluxo de infusão utilizado foi de 80 ml/min, sendo injetado 10ml em cada ponto, total de 40ml por sessão.

**Figura 01.** Aparelho de carboxiterapia utilizado na pesquisa.



**Fonte:** autores

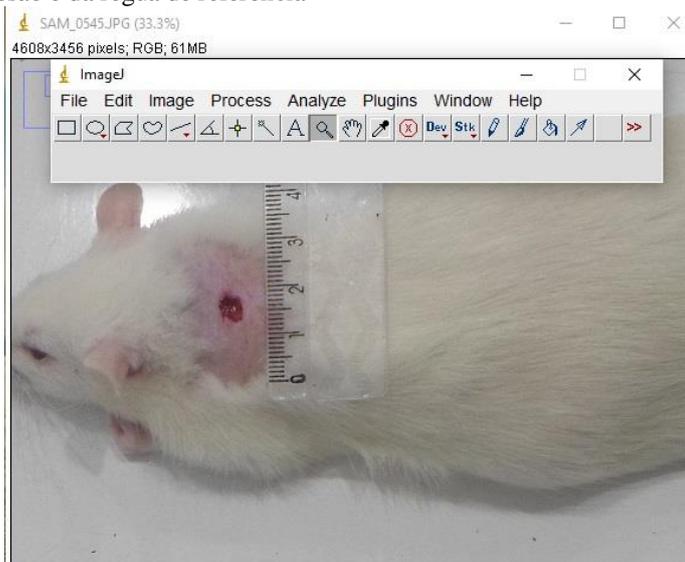
## **4.7. Métodos de Análise**

### **4.7.1. Análise Fotogramétrica**

A avaliação morfométrica das lesões consistiu na mensuração relativa das dimensões físicas das lesões. Para isso, foi empregada a técnica de fotogrametria computadorizada a partir de imagens digitais das lesões obtidas em cada sessão realizada.

Para a obtenção destas imagens foi empregada uma câmera fotográfica digital da marca Samsung®, modelo Samsung es95® de 16.2 megapixels. As imagens foram obtidas sem zoom, sempre em um plano frontal e a uma distância padronizada de 30cm das lesões, com auxílio de um tripé. Essas imagens enquadraram a lesão e uma fita milimetrada, que serviu como referência para calibração das medidas obtidas pelo *software* de análise fotogramétrica (Figura 02).

**Figura 02.** Utilização do *Software ImageJ®*. Enquadramento da lesão e da régua de referência

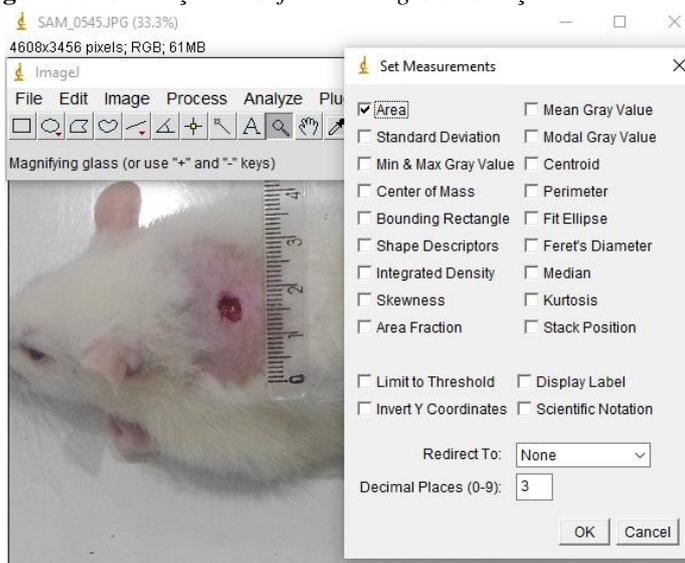


**Fonte:** autores

O *software* empregado para realizar as análises de parâmetros morfométricos deste estudo foi o *ImageJ®* que vem sendo largamente utilizado em estudos sobre o acompanhamento da evolução de úlceras (MINATEL *et al.*, 2009; KORELO, 2013).

O parâmetro morfométrico de avaliação das lesões utilizado neste estudo foi a área. Para essa mensuração, após a visualização da imagem da lesão pelo *software ImageJ®*, inicialmente se ajustou a programação no *software* para que a apresentação do resultado final demonstre somente o parâmetro desejado. Esse ajuste foi necessário apenas a cada uso do programa e para isso se clicou nos seguintes comandos: *Analyze >>> Set Measurements...* Na janela que se abriu (*Set Measurements*) seleciona-se então o seguinte comando: “*Area*”.

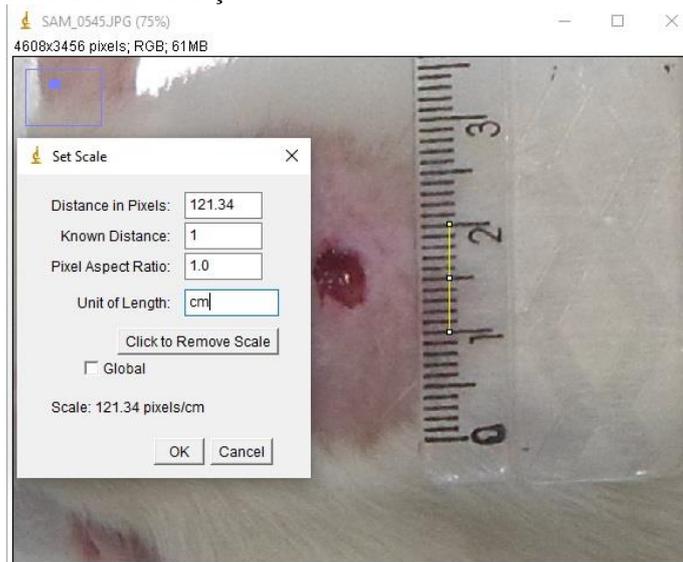
**Figura 03.** Utilização do *Software ImageJ®*. Seleção da medida área.



**Fonte:** autores

Em seguida se realizou a calibração de cada imagem para a análise. Tal calibração consistiu em traçar uma linha na fita de distância de 1cm (distância conhecida) e em seguida clicar nos seguintes comandos: *Analyze >>> Set Scale*. Dentro da janela aberta pelo comando (*Set Scale*,) foi preenchido o espaço “*Known Distance*” com o valor “1” (que corresponde à distância de 1cm da fita) e por fim se informou a unidade de medida em “cm” no espaço “*Unit of Length*”.

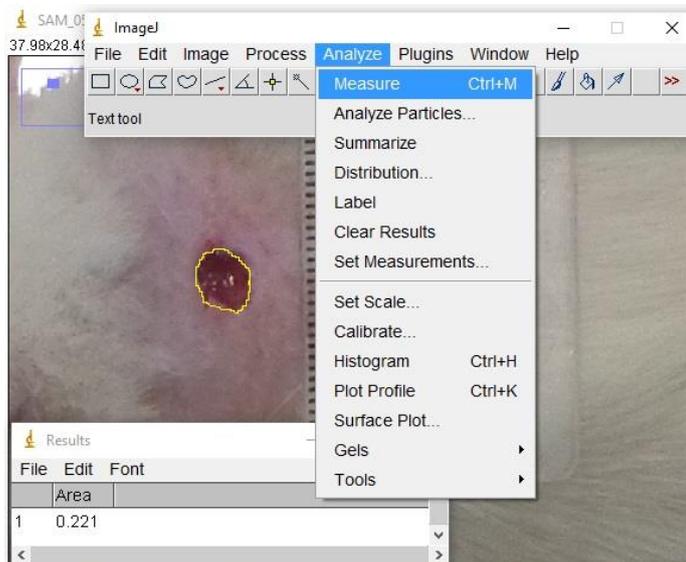
**Figura 04.** Utilização do *Software ImageJ®*. Delineamento da referência e calibração.



**Fonte:** autores

A partir desses ajustes iniciais do programa se iniciou então o procedimento de mensuração do parâmetro de avaliação. Com a ferramenta “*freehand selections*” (“”) se desenhou com o mouse o exato contorno definido pelas bordas das lesões.

**Figura 05.** Utilização do *Software ImageJ®*. Obtenção do resultado morfométrico da lesão.



**Fonte:** autor

Em seguida se clicou nos comandos *Analyze >>> Measure*, que então apresentou uma última janela com o resultado de morfometria da lesão.

Para não haver variação no padrão de definição das bordas das lesões, um único e previamente treinado avaliador realizou essas mensurações, mantendo os mesmos critérios para sua execução.

#### 4.7.2. Análise Histopatológica

##### 4.7.2.1. Preparação das lâminas histológicas

Após fixar as amostras em formol, estas foram desidratadas em banhos crescentes de álcool para então clarificá-las com xilol, seguido de infiltração de parafina a 60° C. Com o término do processamento, o material foi incluído em blocos de parafina, cortados em micrótomo (5µm) e montado em lâminas silanizadas.

Para coloração de Hematoxilina e Eosina as lâminas foram desparafinizadas em xilol, hidratadas em banhos decrescentes de álcool até a água destilada, corada em Hematoxilina de Mayer, seguida da coloração de Eosina-Floxina. Foi desidratada em banhos crescentes de álcool e clarificada em xilol. Uma vez coradas, as lâminas estavam prontas para serem montadas e analisadas.

A coloração de Picro-Sírius Red ocorreu após desparafinização das lâminas com xilol e re-hidratação com o uso de concentrações decrescentes de álcool. Os cortes histológicos foram mantidos por 15 minutos em solução de Sírius Red (F 3B 200, Mobay Chemical Co., Union, NJ, USA) dissolvido em ácido pícrico aquoso saturado. Em seguida, os cortes foram lavados em água corrente e contra-corados com hematoxilina de Harris, por cinco minutos.

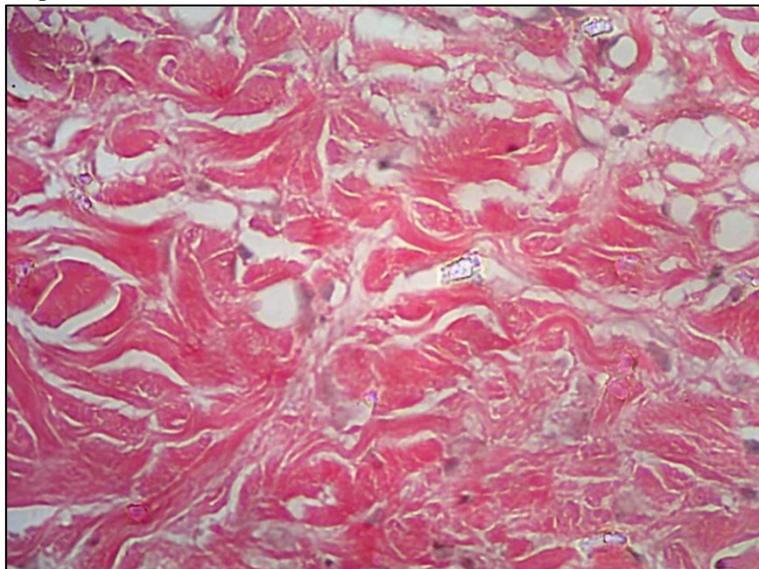
##### 4.7.2.2. Registro fotográfico das lâminas em Microscópio

A retirada imagens histológicas das lâminas ocorreu no Laboratório de Reprodução, Sanidade e Nutrição Animal (LARSANA) da UFOPA. O registro foi feito no Microscópio Nikon E200, de luz polarizada. Esse aparelho tem como opcional Câmera 5mp Moticam Quimis que funciona em conjunto com o computador do laboratório.

A captura das imagens foi feita sempre pelo mesmo avaliador, previamente treinado, em estudo cego. Inicialmente, a lâmina era visualizada com a objetiva de 4x para localizar o centro da lesão. Em seguida, para objetiva de 10x, depois, para objetiva de 40x. Então, retirava-se 10 fotos de campos diferentes de cada lâmina, com a imagem do tecido

preenchendo toda a tela, com o melhor foco possível, sempre com a mesma intensidade de luz.

**Figura 06.** Registro fotográfico utilizando Microscópio com câmera acoplada. Aumento de 400x.



**Fonte:** Autores

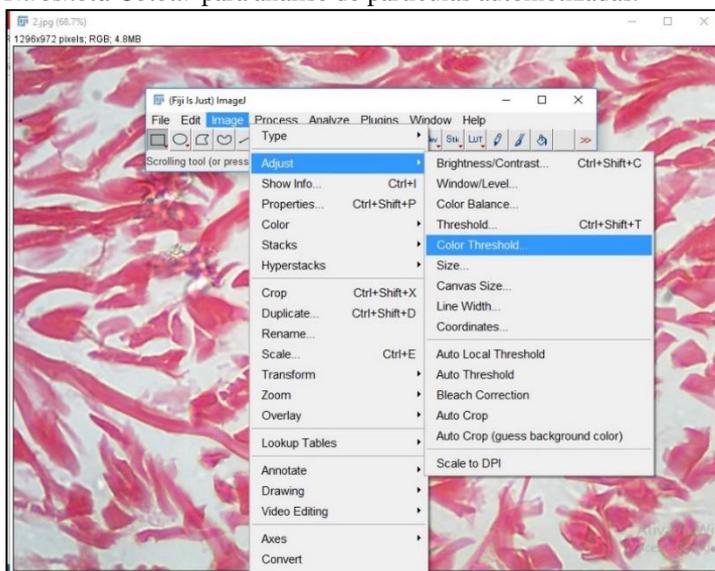
#### 4.7.2.3. Avaliação Quantitativa do Colágeno no *Software ImageJ*®

Para quantificar as fibras de colágeno, foram utilizadas as imagens das lâminas coradas com Picro-Sirius Red. Estas foram avaliadas no *Software ImageJ*®, com o *plug-in Threshold Colour*, que obtêm o percentual de colágeno por meio da análise de partículas automatizadas de acordo com seleção e medida das áreas com base na cor. Esse software é gratuitamente disponível na internet e muito utilizado em pesquisas científicas. Essa pesquisa seguiu o protocolo usa por Bedoya (2016) e por Melo (2017).

Esse programa possibilita avaliar a área percentual ocupada pelos tipos de fibras colágeno em cada corte histológico. As fibras de colágeno tipo I (maduras) e III (imaturas) coradas com picrosirius têm propriedades birrefringentes, possibilitando a diferenciação conforme as suas variações de cores. O Colágeno tipo I apresenta-se mais espesso, justaposto, com cores entre amarelo, laranja e vermelho. Já o colágeno tipo III, suas fibras são mais finas, dispersas, pouco refringentes e com coloração verde.

Para essa mensuração, visualizava-se a imagem histológica no *software ImageJ*®. Inicialmente, para análise do colágeno tipo I, clicava-se nos seguintes comandos: *Image >>> Adjust >>> Color Threshold* (Figura 07).

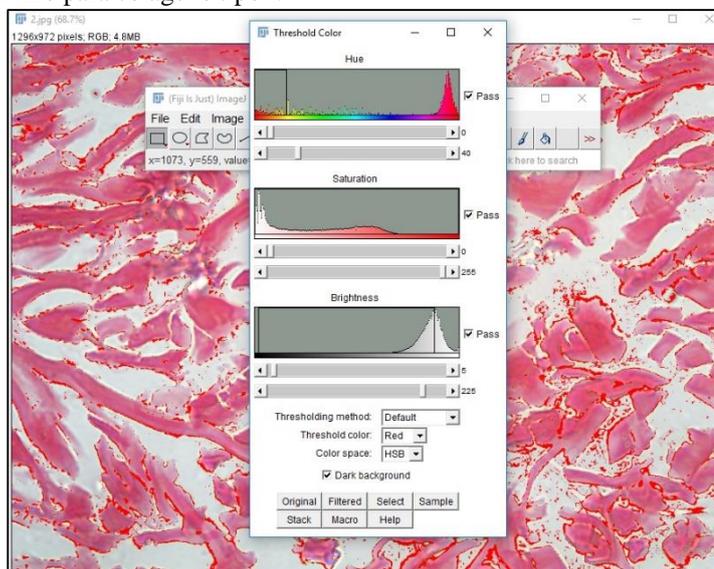
**Figura 07.** Utilização do *Software ImageJ*®. Abertura do *plug-in Threshold Colour* para análise de partículas automatizadas.



**Fonte:** autores

Na janela que se abriu (*Threshold Color*), ajustava-se o *Hue* para ficar entre 0 e 40 (matiz para colágeno tipo I, cor vermelha), *Saturation* entre 0 e 255 e *Brightness* entre 5 e 225 (Figura 08).

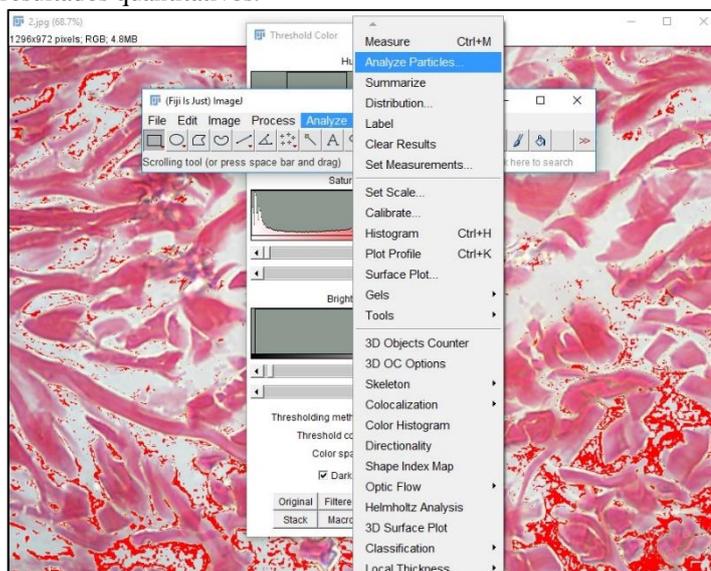
**Figura 08.** Utilização do *Software ImageJ*®. Ajuste cor, saturação e brilho para colágeno tipo I.



**Fonte:** autores

A partir desses ajustes iniciais do programa, era solicitado o resultado quantitativo do percentual da área do colágeno tipo I, seguindo os seguintes comandos: *Analyze >>> Analyze Particles...* (Figura 09).

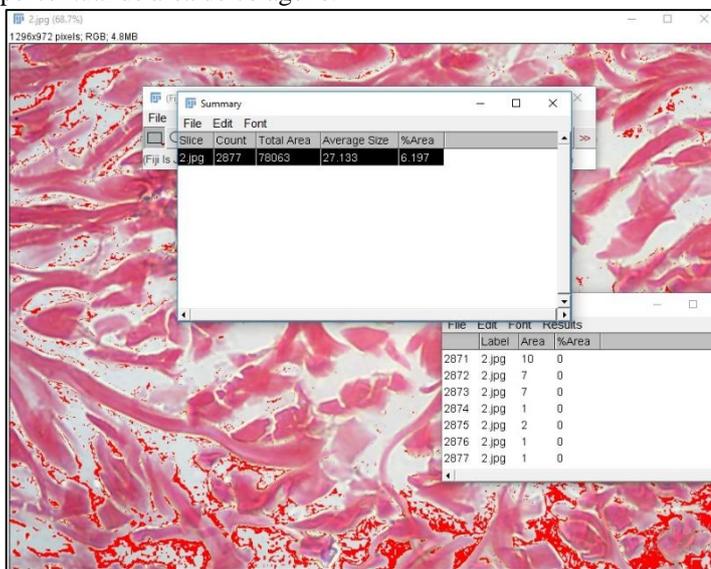
**Figura 09.** Utilização do *Software ImageJ®*. Solicitação dos resultados quantitativos.



Fonte: autores

Após solicitado a *Analyze Particles*, abria-se uma aba com os resultados da área percentual de colágeno tipo I, objeto de estudo dessa pesquisa (Figura 10).

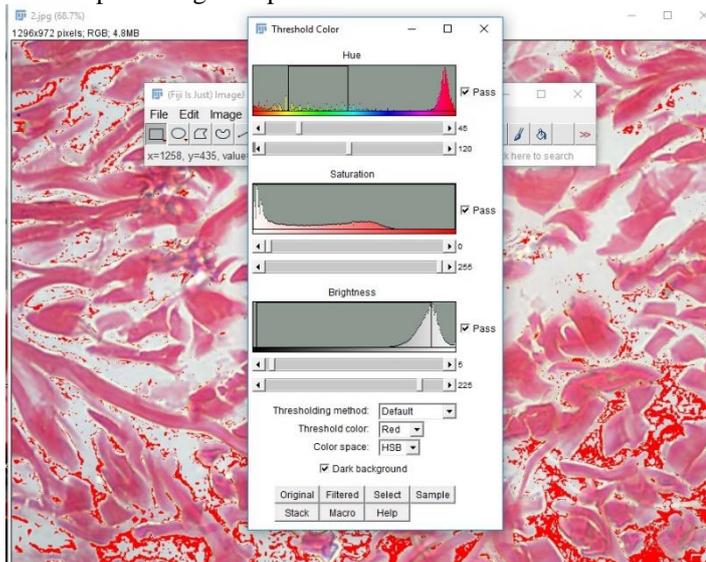
**Figura 10.** Utilização do *Software ImageJ®*. Aba com resultado de percentual de área de colágeno.



Fonte: autores

A avaliação do colágeno tipo III é parecida com a do tipo I, muda apenas que se ajusta o *Hue* para ficar entre 45-120, matiz para a cor verde (Figura 11).

**Figura 11.** Utilização do *Software ImageJ*®. Ajuste cor, saturação e brilho para colágeno tipo III.

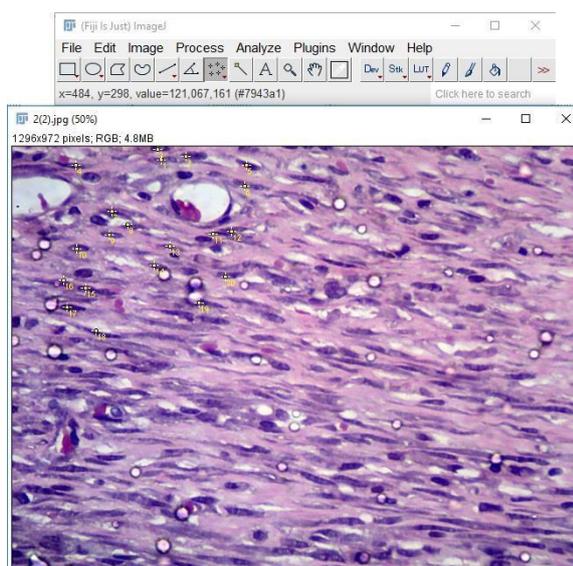


Fonte: autores

#### 4.7.2.4. Avaliação Quantitativa de Fibroblastos e Vasos Sanguíneos no *Software ImageJ*®.

A contagem de fibroblastos e vasos sanguíneos foi realizada nas imagens obtidas das lâminas de Hematoxilina e Eosina, seguindo o mesmo protocolo, em momentos distintos. Após a visualização da imagem no *Software ImageJ*®, os fibroblastos ou vasos sanguíneos presentes eram reconhecidos e marcados pelo pesquisador com o auxílio da ferramenta *Multi-point* (Figura 12). Foram avaliados 10 campos de grande aumento (400x).

**Figura 12.** Utilização do *Software ImageJ*®. Contagem de fibroblastos com o auxílio da ferramenta *Multi-point*.



Fonte: autores

#### **4.8. Tratamento Estatístico**

Os dados relativos a essas análises foram tabulados em planilhas do software Excel (*Microsoft*® - EUA), e posteriormente receberam o tratamento estatístico pelo *software* BioEstat 5.0. Para este estudo experimental foi admitido o nível de significância de 0,05 ( $\alpha=0,05$  ou 5%), para um erro amostral de 5% em todas as análises.

Para análise descritiva foram utilizados medidas de tendência central e dispersão. Na análise inferencial foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro wilk. Os dados com distribuição normal foram submetidos ao teste paramétrico *t* de student e os dados com distribuição não normal foram submetidos ao teste não-paramétrico Mann-whitney.

## 5. RESULTADOS

Os resultados observados na avaliação morfométrico da área da lesão, tanto do grupo controle quanto do grupo carboxiterapia, são apresentados na Tabela 01 e no Gráfico 01 abaixo. Os dados de área em centímetros quadrados então dispostos conforme o dia do experimento e seu respectivo grupo, a média e o desvio padrão. Foi realizado também a aplicação do teste estatístico Teste t de Student, a fim de identificar as correlações significantes entre os grupos, no 1º, 3º, 7º e 11º de experimento.

**Tabela 01.** Área em centímetros quadrados das feridas em ratos Wistar no 1º, 3º, 7º e 11º de experimento.

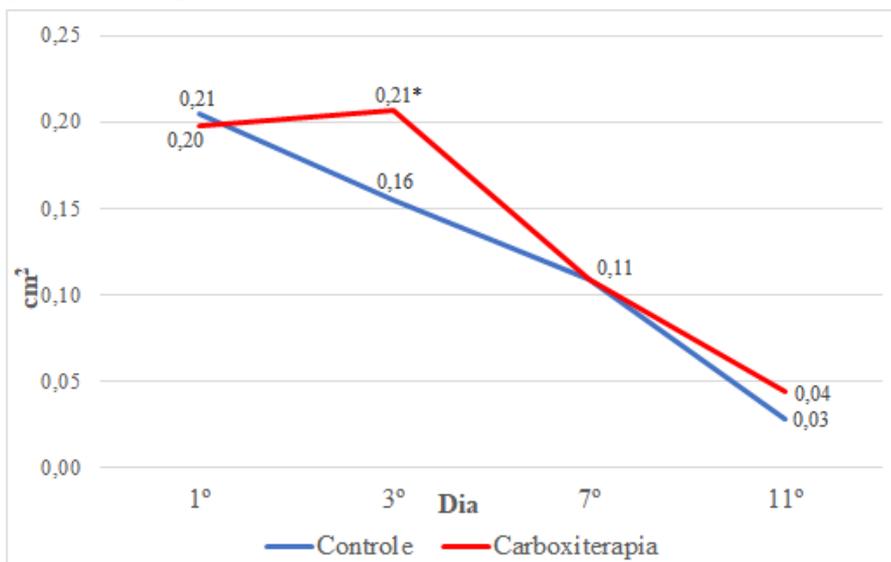
	1º		3º		7º		11º	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
GC	0,21	0,03	0,16	0,02	0,11	0,03	0,03	0,09
GCa	0,20	0,04	0,21	0,04	0,11	0,01	0,04	0,03
<i>t de student</i>	<i>T</i>	<i>P</i>	<i>T</i>	<i>P</i>	<i>T</i>	<i>P</i>	<i>T</i>	<i>P</i>
	0,371	0,720	-3,042	0,016*	0,000	1,000	-1,150	0,314

DP: Desvio Padrão; GC: Grupo Controle; GCa: Grupo Carboxiterapia; Teste t de Student para correlação entre os grupos, com os valores de *t* e *p*.

\* $p < 0,05$ .

Fonte: autores

**Gráfico 01.** Correlação entre os tamanhos das áreas dos grupos dessa pesquisa, pelo Teste t de Student.



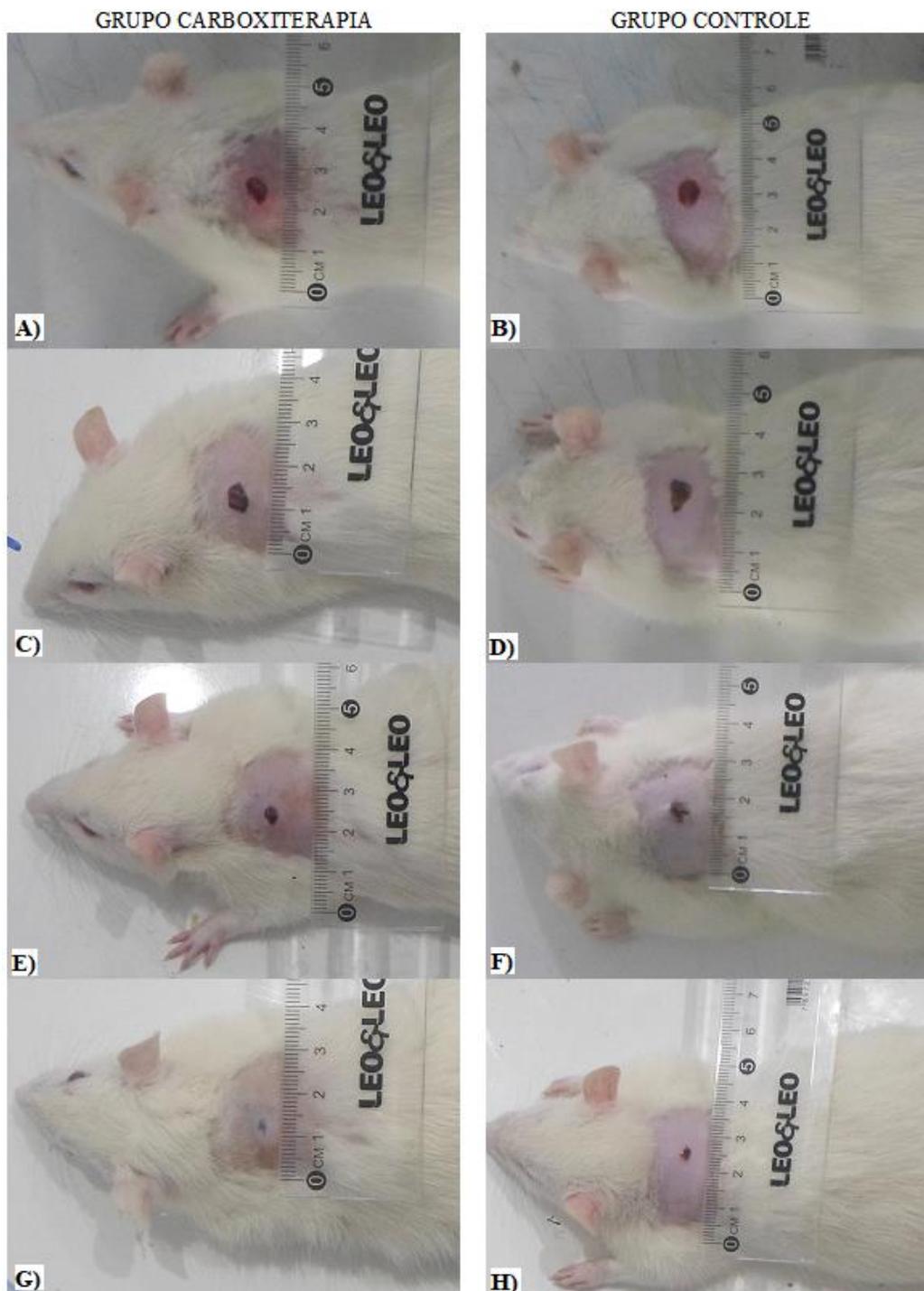
\* $p < 0,05$

Fonte: autores

No primeiro dia de pesquisa, dia do procedimento cirúrgico de produção da lesão, o grupo controle teve como área  $0,21 \pm 0,03 \text{ cm}^2$ , reduziu no 3º, 7º e, no último dia de experimento, 11º dia, apresentou  $0,03 \pm 0,09 \text{ cm}^2$  de área e seu quase total fechamento. O

grupo carboxiterapia teve área  $0,20\pm 0,04\text{cm}^2$  no 1º dia, aumentou no 3º para  $0,21\pm 0,04\text{cm}^2$ , em seguida teve redução no 7º e 11º dia e seu quase total fechamento.

**Figura 13.** Imagens das feridas dos ratos Wistar no 1º, 3º, 7º e 11º de experimento.

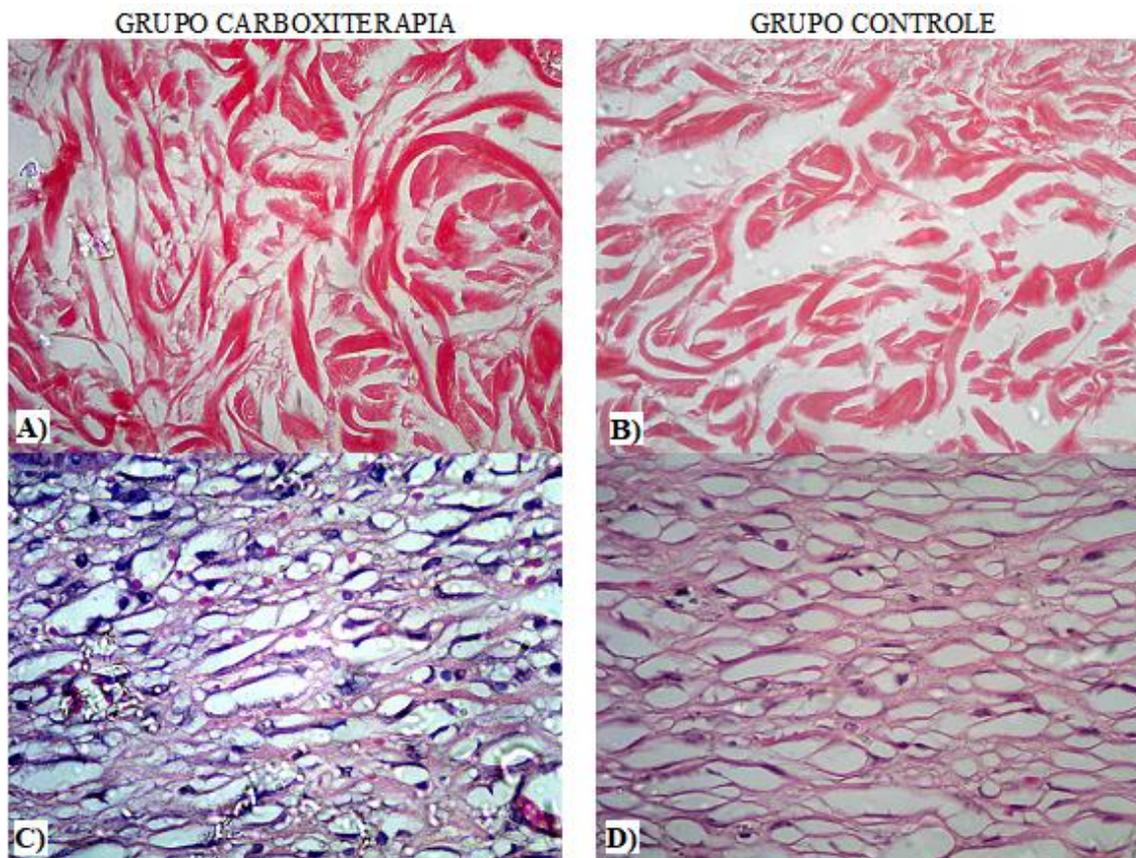


A) e B) 1º dias de experimento; C) e D) 3º dia de experimento; E) e F) 7º dia de experimento; G) e H) 11º dia de experimento.

**Fonte:** autores

O teste de correlação *t* de Student mostrou uma modificação significativa ( $p < 0,05$ ) entre o grupo controle e o grupo carboxiterapia e um valor de *t* negativo. O tratamento de carboxiterapia, as 2 sessões dos primeiros dias, aumentou a média da área de seus animais. Já o grupo controle diminuiu a média de sua área em todos os momentos avaliados.

**Figura 14.** Avaliação histológica após 11 dias de experimento, no grupo controle e carboxiterapia, aumento de 400x



A) Lâmina corada com Picro-Sirius Red para avaliação de colágeno, grupo carboxiterapia; B) Lâmina corada com Picro-Sirius Red para avaliação de colágeno, grupo controle; C) lâmina corada com Hematoxilina e Eosina para análise de fibroblastos e neovascularização, grupo carboxiterapia; D) lâmina corada com Hematoxilina e Eosina para análise de fibroblastos e neovascularização, grupo controle.

**Fonte:** autores

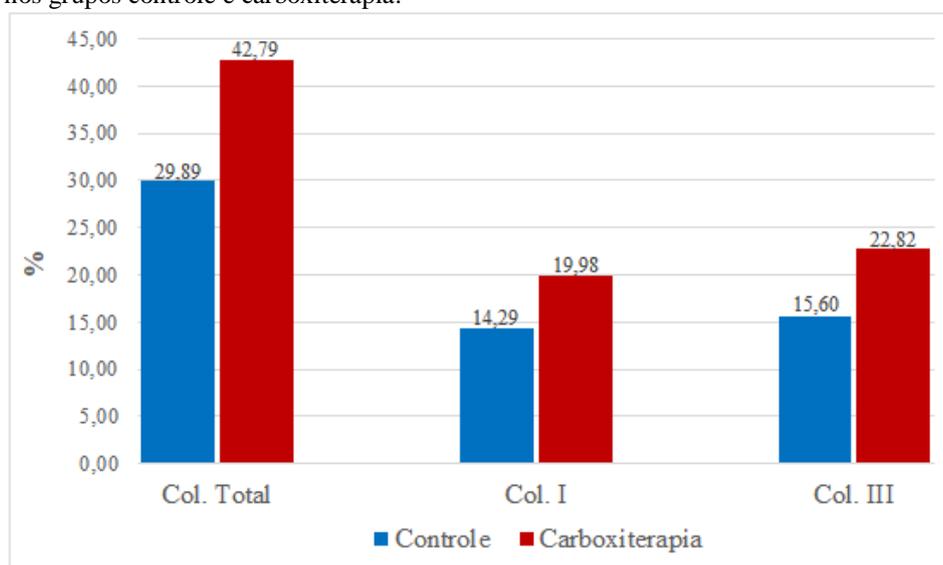
Para facilitar ainda mais a visualização das variações do percentual de área de colágeno produzido por cada grupo, a Tabela 02 e a Gráfico 02 abaixo apresentam os resultados dos dados através do teste estatístico Teste *t* de Student, a fim de identificar as correlações significantes entre os grupos. Esses resultados foram obtidos no 11º dia de experimento, após 10 sessões consecutivas de carboxiterapia no grupo tratado.

**Tabela 02.** Percentil de área média de colágeno tipo I e III dos grupos controle e carboxiterapia.

	Colágeno I		Colágeno III		Colágeno Total	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
GC	14,29	5,72	15,60	10,00	29,89	15,25
GCa	19,98	4,44	22,82	4,44	42,79	7,60
T	-1,7561		-1,3423		-1,6926	
P	0,1171		0,2163		0,1289	

DP: Desvio Padrão; CG: Grupo Controle; GCa: Grupo Carboxiterapia; Teste t de Student para correlação entre os grupos, com os valores de *t* e *p*.

Fonte: autores

**Gráfico 02.** Comparação entre as porcentagens médias de colágeno total, tipo I e tipo III, nos grupos controle e carboxiterapia.

Fonte: autores

O grupo tratado com carboxiterapia, após 10 sessões, apresentou média e desvio padrão de  $42,79 \pm 7,60\%$  de colágeno total, divididos em  $19,98 \pm 4,44\%$  a área de colágeno tipo I e  $22,82 \pm 4,44\%$  a área de colágeno tipo III. Já o grupo controle, observou-se  $29,89 \pm 15,25\%$ ,  $14,29 \pm 5,72\%$  e  $15,60 \pm 10,00\%$ , respectivamente, para colágeno total, tipo I e tipo III. Esses resultados podem ser melhores comparados no Gráfico 02.

O teste de correlação t de Student mostrou relação com valor de T negativo, o que determina que a carboxiterapia produziu maior área percentual de colágeno total, tipo I e tipo III, comparado ao grupo controle. Entretanto, esses dados não são estatisticamente significativos ( $p > 0,05$ ).

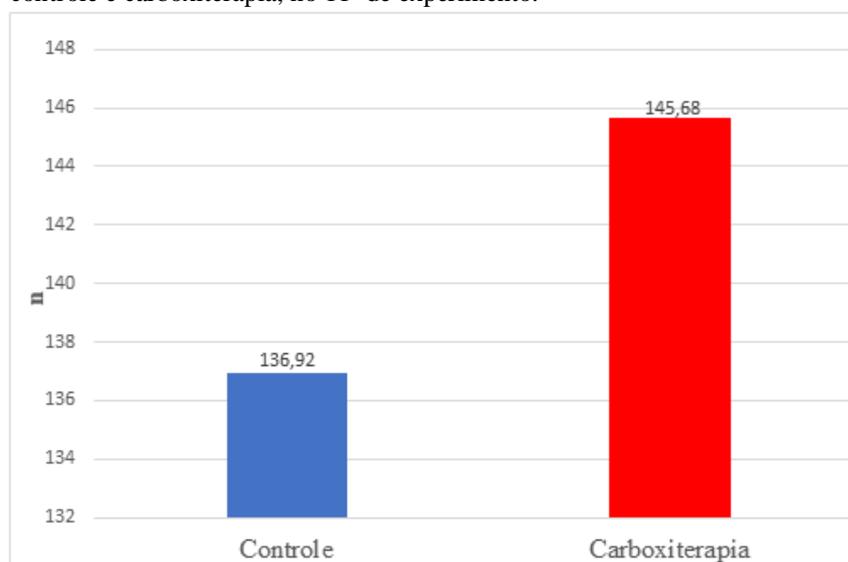
A seguir, a Tabela 03 e os Gráficos 03 e 04, apresentam os números da média e o desvio padrão de fibroblastos e de novos vasos sanguíneos formados, no 11º dia de pós-operatório e 10 sessões consecutivas de carboxiterapia no grupo tratado.

**Tabela 03.** Números de fibroblastos e vasos sanguíneos nos grupos controle e carboxiterapia.

	Fibroblastos		Vasos Sanguíneos	
	Média	DP	Média	DP
GC	136,92	5,55	1,88	0,30
GCa	145,68	6,68	3,04	0,46
T	- 2,2543		-4,7357	
P	0,0541		0,0015*	

DP: Desvio Padrão; CG: Grupo Controle; GCa: Grupo Carboxiterapia; Teste t de Student para correlação entre os grupos, com os valores de *t* e *p*. \* $p < 0,05$

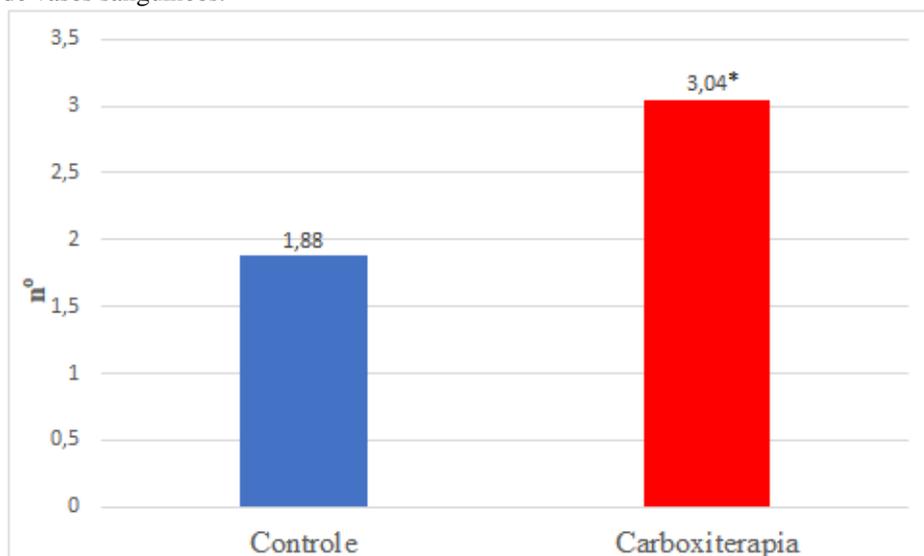
Fonte: autores

**Gráfico 03.** Comparação entre o número total de fibroblastos nos grupos controle e carboxiterapia, no 11º de experimento.

Fonte: autores

Os resultados dessa pesquisa referente ao número de fibroblastos foram  $145,68 \pm 6,68$  para o grupo carboxiterapia e  $136,92 \pm 5,55$  para o grupo controle. O teste de correlação t de Student mostrou valor de T negativo, ou seja, no grupo de tratamento, houve maior proliferação de fibroblasto, resultado melhor visualizado no Gráfico 03. Entretanto, apesar do grupo carboxiterapia ter maior número de fibroblasto, esse resultado não foi significativo estatisticamente ( $p > 0,05$ ).

**Gráfico 04.** Comparação entre os grupos controle e carboxiterapia, quanto ao número de vasos sanguíneos.



Fonte: autores

Os resultados apresentados na Tabela 03 e no Gráfico 04, referente ao processo de neovascularização das lesões cutâneas de ratos saudáveis. Após 10 sessões de terapia com aplicação de gás carbônico medicinal por via subcutânea, o grupo tratado apresentou média e desvio padrão de  $3,04 \pm 0,46$ , já o grupo controle dessa pesquisa teve resultado de  $1,88 \pm 0,30$ . A avaliação de correlação pelo teste t de Student teve T negativo, o que mostra que houve maior número de novos vasos sanguíneos no grupo carboxiterapia. Vale ressaltar que esse resultado foi estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ).

## 6. DISCUSSÃO

O rato Wistar é muito utilizado em pesquisas para avaliação de cicatrização. A pele desse animal é bastante parecida com a dos humanos, mas não é igual. Wistar não forma cicatrizes hipertróficas ou queloides, não forma tecido adiposo subcutâneo, não há definição entre derme papilar e derme reticular, sua derme é mais espessa, seus vasos sanguíneos são subdérmicos (SANTOS, 2006; BETTES, 2003, CEPEDA, 2015). Essas diferenças podem gerar resultados diferentes entre pesquisas com animais e em humanos. Entretanto, a pesquisa experimental é um grande passo para comprovação de terapias, para posteriores serem utilizadas em humanos de forma segura e com comprovada eficácia.

A carboxiterapia, por ser uma técnica de aplicação hipodérmica, pode sofrer grande influência na sua administração nesse animal. O gás, por ser uma substância de fácil difusão, pode se perder com maior facilidade pela falta do tecido adiposo subcutâneo. Isso dificultaria a ação do gás que é de estimular a liberação do oxigênio para o tecido e melhorar a microcirculação do local, o chamado efeito Bohr (BORGES, 2008; LEE, 2010; DE LYRA et al., 2012). Nessa pesquisa, observou-se em algumas aplicações, principalmente na primeira sessão, o escape do gás pela própria lesão produzida no animal.

O processo de cicatrização é dificultado por fatores internos do organismo e fatores relacionados à lesão. Pacientes com diabetes, vasculite, imunodeprimido, uso de corticoides, Hanseníase têm maior facilidade de cronificar lesões cutâneas. Feridas infectadas, queimaduras, necrosadas têm maior dificuldade de fechar (DUTTON, 2010; KUMAR, 2013). Essa pesquisa realizou lesões em ratos saudáveis e em feridas limpas. Os grupos seguiram seu processo natural de cicatriza, passando pelas fases inflamatória, proliferativa e remodelação. Talvez um estudo com feridas crônicas, complexas trariam um resultado diferente quanto a contração e fechamento da ferida.

Penhavel (2013) avaliar também o efeito cicatrizante da terapia com dióxido de carbono em feridas cutâneas induzidas em 16 ratos. As lesões forma de 2,5cm de diâmetro, tratadas no dia 1º, 3º, 6º e 9º de pós-operatório, um total de 4 sessões. As imagens das lesões foram registradas no dia da operação, 6º e no 14º após produção das lesões. Seus resultados foram parecidos com a presente pesquisa, ao final de seu experimento o grupo carboxiterapia não obteve cicatrização significativa compara ao grupo controle. Outra pesquisa, de Sönmez

et al. (2009), apesar de mostrar resultado significativo quanto a formação de novos vasos, não teve números satisfatórios quanto o parâmetro área da lesão após carboxiterapia.

Paulo (2016) verificar o efeito da carboxiterapia em ferida cutânea 1,5cm de diâmetro aberta contaminada no dorso de 15 ratos Wistar. Os animais receberam 5 sessões, do 1º dia ao 5º dia de pós-operatório, injetado 2 ml de gás carbônico em cada local. Houve diminuição da ferida em ambos os grupos constatado pelas fotografias das lesões. Relata que é possível que a dose utilizada não tenha sido a ideal, bem como o tempo de aplicação do gás carbono, ou de fato o gás carbônico, apesar do seu efeito vasodilatador não alterou a cicatrização. Sua explicação também pode ser usada na presente pesquisa, pois a carboxiterapia ainda não tem protocolo definido para o tratamento de feridas cutâneas.

Um dado chama a atenção nos resultados dessa pesquisa. A área da lesão aumentou com a aplicação de carboxiterapia nas primeiras após 2 sessões, nas imagens registradas no 3º dia de experimento. Isso pode ser explicado pelo efeito vasodilatador do gás carbônico (BORGES, 2008; DE LYRA, 2012) e consequente aumento do processo inflamatório, com intenso extravasamento de líquido e células imunes (SÖNMEZ et al 2009; ALVES 2012; KUMAR, 2013). Outra explicação pode ser devido à tensão da pele e formação de um enfisema subcutânea, observado logo após aplicação da técnica (ZELENKOVÁ, 2017)

Cepede (2015) também avaliou a evolução macroscópica de lesões cutâneas em ratos, porém, realizou o tratamento com radiofrequência. Seus resultados foram parecidos com esta pesquisa. Na comparação entre o grupo controle e o grupo com tratamento, houve área da ferida no 3º dia significativamente menor no grupo controle. Na mesma pesquisa, a análise histológica mostrou aumento do processo inflamatório no grupo com terapia. Esta pesquisa colabora com a hipótese da carboxiterapia aumentar a área da lesão devido às células de defesa e ao extravasamento de líquido nos primeiros no 3º de experimento.

Piazzolla (2011), em seu estudo em humanos, estudou o efeito da carboxiterapia na redução do diâmetro e área das úlceras vasculares em 32 pacientes com 39 úlceras por meio de aplicações semanais de injeções subcutâneas de gás carbônico, nas bordas da úlcera. As úlceras eram fotografadas antes e após o tratamento. Houve redução da área e dos diâmetros das úlceras ( $p < 0,05$ ). A cicatrização completa ocorreu em 38% dos pacientes. O tecido fibroso das úlceras vasculares reduziu de 71% para 20%. A carboxiterapia mostrou-se eficaz,

reduzindo a área da ferida, melhorando a cicatrização. Essa pesquisa mostra que úlceras crônicas de difícil podem ser beneficiadas com a carboxiterapia.

Quanto aos aspectos histológico, esta pesquisa não obteve resultado significativo quanto ao depósito de colágeno e proliferação de fibroblastos. Outras pesquisas também tiveram resultados semelhantes. De Lyra et al. (2012) pesquisou a eficácia do gás carbônico no tratamento de queimaduras em ratos 24 ratos Wistar adultos. Sua pesquisa utilizou um grupo controle, um grupo com 2 sessões de carboxiterapia por semana e outro com 3 sessões semanais. Cada sessão de carboxiterapia consistiu em uma aplicação de 10 a 20 ml de gás carbônico na derme das áreas queimadas. O estudo histológico de proliferação de fibroblastos, avaliado em notas de 0 a 4 cruces, não mostrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos pesquisados.

Ferreira et al. (2008) avaliou o aumento do turnover de colágeno induzido pela injeção intradérmica de dióxido de carbono em 10 ratos machos Wistar. Seu grupo controle recebeu injeções de solução salina 0,9%. Obteve o resultado de maior depósito de colágeno nos animais tratados. Maia-Figueiró et al. (2012) também avaliou o estímulo a produção de colágeno por fibroblastos dérmicos. Em sua pesquisa, houve proliferação de fibroblastos estatisticamente significativa e proliferação de colágeno.

Brochado et al. (2019), examinou a influência da carboxiterapia na cicatrização de feridas sob insuficiência venosa em feridas excisionais Wistar, divididos em três grupos com 32 ratos cada: grupo de limpeza diária com solução salina a 0,9%, grupo tratado com sulfadiazina de prata a 1% e grupo carboxiterapia, aplicação subcutânea de 0,3 mL de dióxido de carbono. Os períodos predeterminados de análise foram o 3º, 7º, 14º e 30º dia. A presença de colágeno aumentou significativamente nos grupos sulfadiazina e carboxiterapia, porém, este último grupo apresentou melhor organização das fibras. Quanto a migração de fibroblastos, o grupo carboxiterapia aumenta significativamente no 7º de experimento comparado aos outros grupos. Durães (2012) também teve resultado significativo no uso de carboxiterapia quanto ao aumento da quantidade de colágeno em seu estudo dos possíveis efeitos da carboxiterapia na integração de enxertos condrocútâneo em orelhas de coelhos. Estes estudos mostram um possível benefício da carboxiterapia quanto ao depósito de colágeno e fibroblastos.

Essa pesquisa teve resultado estatisticamente significativo para o grupo tratado com carboxiterapia quanto a formação de novos vasos sanguíneos na área da lesão. Esse resultado é de grande importância, pois a cicatrização inadequada de feridas crônicas ocorre em decorrência de déficit de perfusão sanguínea na ferida e nos tecidos próximos. Isso mostra que a terapia com dióxido de carbono aplicado artificialmente tem o potencial de melhorar a perfusão e a oxigenação dos tecidos, portanto, é útil para a cicatrização de feridas crônicas (FINZGAR, 2015).

Irie (2005) pesquisou os efeitos vasodilatadores e angiogênicos dos banhos de água rico em dióxido de carbono. Essa pesquisa induziu isquemia unilateral, dos membros posteriores de camundongos, pela ressecção das artérias femorais. Os membros inferiores então eram imersos em água enriquecida com CO<sub>2</sub> ou água doce como controle, a 37°C por 10 minutos uma vez ao dia. Imagens de doppler a laser, angiografia e imuno-histoquímica foram avaliadas. Os resultados mostraram aumento significativo da perfusão sanguínea, formação de vasos colaterais, densidade capilar e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) no plasma. Brochado et al (2019) também teve em sua pesquisa o predomínio da neovascularização ao utilizar a carboxiterapia. Esses estudos ajudam a entender os resultados apresentados na presente pesquisa.

É importante destacar que esses efeitos da carboxiterapia sobre a microcirculação local, em parte mediadas pelo óxido nítrico (NO), aumentam as propriedades neoangiogênicas, a expressão de fatores angiogênicos, a liberação de VEGF e de fator de crescimento básico de fibroblastos (FGF) e inibem a apoptose de células endoteliais. A presença de NO é importante nas fases inicial e tardia cura de feridas. Essa oxigenação gerada pela carboxiterapia, especialmente, nas feridas de difícil cicatrização e com complicações isquêmicas, tem grande importância para o equilíbrio bioquímico do ambiente e conseqüente melhorar o reparo tecidual (IRIE, 2005; BROCHADO et al 2019).

Os efeitos do dióxido de carbono sobre a microcirculação também foi objeto de estudo de Minamiyama (2010) que a microvasculatura *in vivo* e taxa de fluxo sanguíneo usando um sistema video-microscópico intra-vital em ratazanas. Esse estudo mediu o diâmetro interno e a velocidade das células vermelhas do sangue (Vrbc) para um microvaso. Após aplicação tópica de CO<sub>2</sub> dissolvido em água pela pele do rato, foi observado tanto a vasodilatação quanto o aumento do fluxo sanguíneo dos capilares.

## 7. CONCLUSÃO

Ao final do presente trabalho é possível constatar que a carboxiterapia, após 10 aplicações em feridas cutâneas em ratos saudáveis, em sua análise morfométrica, não aumentou a velocidade de fechamento de área da lesão. Quanto aos aspectos histológicos, apresentou maior depósito de colágeno total, tipo I e tipo III e maior proliferação de fibroblastos comparado ao grupo controle, mas esses dados não foram estatisticamente significativos. Já a avaliação da formação de novos vasos sanguíneos teve um resultado positivo, com números estatisticamente significativos. Isso mostra que a carboxiterapia pode ser uma boa opção de tratamento de feridas cutâneas, principalmente, em lesões com dificuldade de cicatrização devido ao déficit microcirculatório.

Novas pesquisas, com outros métodos e variáveis, são necessárias para uma melhor avaliação dos efeitos do gás carbônico no processo de cicatrização de feridas cutâneas. Principalmente, para verificar o melhor momento de início de aplicação da técnica, a dosimetria e o número e intervalo de sessões.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, A. N. **Influência da laserterapia de baixa potência na regeneração do músculo esquelético e no remodelamento da matriz extracelular após lesão aguda.** Dissertação (Mestrado em Ciências das Raebilitação) – Universidade Nove de Julho. São Paulo, SP. 2012.
- AMBROSI C, DELANOE G. Therapeutic effect of CO2 injected sub-cutaneously in arteriopathies of the limbs. Experimental research (author's transl) *Ann Cardiol Angeiol (Paris)*. 1976 Mar-Apr; 25(2):93-8. Apud In Yamaguchi C. **I Annual Meeting of Aesthetic Procedures**. São Paulo: Santos, 2005: 575-79.
- BEDOYA, S.A.O. et al. Caracterização de colágenos tipos I e III no estroma do carcinoma de células escamosas cutâneo em cães. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** [online]. 2016, vol.68, n.1, pp.147-154. ISSN 1678-4162. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4162-8484>.
- BETTES, P.S.L. **Análise comparativa histológica etensiométrica entre a cicatrização deferidas cutâneas tratadas com o adesivoocetil-2-cianoacrilato e com sutura intradérmica em ratos.** Tese (Doutorado em Clínica Cirúrgica) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2003.
- BRANDI CD, ANIELLO C, GRIMALDI L, CAIAZZO E, STANGHELLINI E. Carbon Dioxide Therapy: Effects on skin irregularity and its use as a complement to liposuction. **Aesth Plast Sug**, 2004.
- BRANDI et al. Carbon dioxide therapy in the treatment of localized adiposities: Clinical study and histopathological correlations. **Aesth Plast Surg**. 2001 (25): 170-170.
- BRANDI, C.G.L; NISI, G.; BRAFA, A.; CAMPA, A.; CALABRO, M.; CAMPANA, N.; D'ANIELLO, C. The Role Of Carbon Dioxiede Therapy In The Treatment Of Chronic Wounds. **IN VIVO**, 2010.
- BRASILEIRO FILHO, Geraldo. **Bogliolo patologia**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.
- BROCHADO TMM, DE CARVALHO SCHWEICH L, DI PIETRO SIMÕES N, OLIVEIRA RJ, ANTONIOLLI-SILVA ACMB. Carboxytherapy: Controls the inflammation and enhances the production of fibronectin on wound healing under venous insufficiency. **Int Wound J**. 2019 Apr;16(2):316-324. doi: 10.1111/iwj.13031. Epub 2018 Nov 22.
- BROCKOW T, HAUSNER T, DILLNER A, RESCH KL. Clinical evidence of subcutaneous CO2 insufflations: a systematic review. **J Altern Complement Med**. 2000 Oct; 6(5):391-403.
- CAMPOS, Antonio Carlos Ligocki; BORGES-BRANCO, Alessandra; GROTH, Anne Karoline. Cicatrização de feridas. **ABCD, arq. bras. cir. dig.**, São Paulo , v. 20, n. 1, p. 51-58, Mar. 2007.

CARVALHO, ACO, VIANA, PC, ERAZO, P. Carboxiterapia – Nova Proposta para Rejuvenescimento Cutâneo. **In Yamaguchi C. I Annual Meeting of Aesthetic Procedures**. São Paulo: Santos, 2005: 575-79.

CEPEDA, Ana Maria Cardoso. **Efeitos da radiofrequência na cicatrização de feridas cutâneas em ratos: análise por planigrafia digital e avaliação histológica**. Dissertação mestrado em Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2016.

Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA. Disponível em:<  
[http://ses.sp.bvs.br/lis/resource/35979#.Ww651Sin\\_IU](http://ses.sp.bvs.br/lis/resource/35979#.Ww651Sin_IU). Acesso em: 28 de Maio de 2018.

CORRÊA, MICHELE SANTOS; GONTIJO, ÉRIKA GOMES; TONANI, RENATA LOPES; REIS, MÁRCIA LOPES; BORGES, FABIO DOS SANTOS. Análise da eficácia da carboxiterapia na redução do fibroedema gelóide: estudo piloto. **Revista Fisioterapia** Ser. v. 3, n.2. Abr/Mai/Jun, 2008.

CUNHA, Núbia Broetto et al. Uso do laser, 670 nm, no quadro algico de ratos submetidos à modelo experimental de cialgia. **Rev Bras Med Esporte** [online]. 2008, vol.14, n.2, pp.115-118. ISSN 1517-8692. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-86922008000200006>.

DE LYRA, Marcos Carneiro et al. Tratamento de queimaduras de carboxiterapia em modelo experimental. **Rev Bras Queimaduras**, v. 11, n. 1, p. 2-5, 2012.

DURÃES, Eliana Ferreira Ribeiro. **Efeitos da carboxiterapia na integração de enxertos condrocitâneos em coelhos. 2012**. 100 f., il. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) -Universidade de Brasília, Brasília, 2012.

DUTTON, Mark. **Fisioterapia ortopédica [recurso eletrônico]: exame, avaliação e intervenção** - 2. ed. - Dados eletrônicos. - Porto Alegre: Artmed, 2010.

FABRY R, DUBOST JJ, SCHMIDT J, BODY J, SCHAFF G, BAGUET JC. Thermal treatment in arterial diseases: an expensive placebo or an effective therapy? **Therapie**. 1995 Mar-Apr; 50(2):113-22. 30

FERREIRA, JCT, HADDAD, MD, TAVARES, SAN. Increase in collagen turnover induced by intradermal injection of carbon dioxide in rats. **Journal of Drugs in Dermatology**: March 1, 2008.

FINZGAR, Miha; MELIK, Ziva; CANKAR, Ksenija. Effect of transcutaneous application of gaseous carbon dioxide on cutaneous microcirculation. **Clinical hemorheology and microcirculation**, v. 60, n. 4, p. 423-435, 2015.

FRANCESCO, A, LATTARULO, P, PARASSONI, L, CURRI, SB, VARLARO, V, GUIDI, F. Effetti sul microcircolo di differenti dosi di CO2 nella pannicolopatia edemato-fibrosclerotica da stasi (“cellulite”). **Rivista Italiana di Medicina Estética** n2, anno 1998.

GÓES MGC. **Carboxiterapia: uma experiência surpreendente**. Trabalho monográfico apresentado ao 1º Capítulo Brasileiro de Medicina e Cirurgia Estética, Curso de Pós-

graduação em Medicina e Cirurgia Estética, como requisito parcial para a obtenção do Grau de Pós Graduação em Medicina Estética. Salvador, 2005.

GOLDMAN, MP, BACCI, PA, LEIBASHOFF, G, HEXSEL, D, ANGELINI, F. Carboxytherapy. In: Goldman *et al.* Cellulite –Pathophysiology and Treatment. **New York: Taylor & Francis**, 2006: 197-208.

GULIAEVA, EM, GRIGOR'EVA, VD, DEREVNINA, NA, GONTAR', EV. The effect of carbon dioxide baths and applications of low-temperature peloids on the immune function of patients with psoriatic arthritis. **Voprosy Kurortol Fizioter Lech Fiz Kult.** 1999 May – Jun; (3):31-5. 31

IRIE, H., TATSUMI, T., TAKAMIYA, M., ZEN, K., TAKAHASHI, T., AZUMA, A., MATSUBARA, H. Carbon dioxide-rich water bathing enhances collateral blood flow in ischemic hindlimb via mobilization of endothelial progenitor cells and activation of NO-cGMP system. **Circulation**, 111, 1523–1529, 2005.

ISAAC, C.; LADEIRA, P.; RÊGO, F.; ALDUNATE, J.; FERREIRA, M. Processo de cura das feridas: cicatrização fisiológica. **Revista de Medicina**, v. 89, n. 3-4, p. 125-131, 19 dez. 2010.

KORELO, R.I.G.; OLIVEIRA, J.J.J.; SOUZA, R.S.A.; HULLEK, R.F.; FERNANDES, L.C. High frequency generator as treatment in scar pressure ulcers: pilot study. **Fisioter. Mov.** Curitiba, v. 26, n. 4, p. 715-724, set./dez. 2013.

KUMAR, Vinay; ABBAS, Abul K.; ASTER, Jon C. **Robbins patologia básica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013.

LANG EV, GOSSLER AA, FICK LJ, BARNHART W, LACEY DL. Carbon dioxide angiography: effect of injection parameters on bolus configuration. **J Vasc Interv Radiol.** 1999 Jan; 10(1):41-9.

LEE, Georgia S. K. Carbon Dioxide Therapy in the Treatment of Cellulite: An Audit of Clinical Practice. **Aesth Plast Surg.** 34:239–243. 2010.

LOBO, J. R.; BARRETO, J. C. C.; ALVES, L. L.; CRISPIM, L. C.; BARRETO, L. A.; LOPEZ JC. Carbon dioxide therapy. **Itália: Uniciversity Hospital of Siena.** 2005. 32

MELO, Gabriela Haro de. **Análise fractal na caracterização de colágenos tipos I e III em feridas dérmicas tratadas com diferentes fontes de plasma rico em plaquetas.** 2017. 35 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, 2017.

MENDONÇA, J. R.; COUTINHO-NETTO, J. Aspectos celulares da cicatrização. **An. Bras. Dermatol.**, v. 84, n. 3, p. 257-262, 2009.

MINAMIYAMA, Motomu; YAMAMOTO, Akemi. Direct evidence of the vasodilator action of carbon dioxide on subcutaneous microvasculature in rats by use of intra-vital video-microscopy. **J Biorheol**, 2010.

MINATEL, D.G. et al. Phototherapy promotes healing of chronic diabetic leg ulcers that failed to respond to other therapies. **Lasers Surg Med** v.4, n.1, p.433-41,2009.

MORALES, B.T. La carboxiterapia em el tratamiento de las úlceras. **Revista panamericana de Flebología y Linfología**. V.13, n.1, 2008.

PARASSONI L, VARLARO, V. La Carbossiterapia: una metodica in evoluzione. **Riv. La Medicina Estetica**. 1997. 21(1). Editrice Salus Internazionale, Roma.

PAULO, Danilo Nagib Salomão; PAVAN, Claudia Cleto; ALMEIDA, L. D. L. F. Efeito da carboxiterapia na cicatrização de ferida cutânea contaminada de ratos. **Salus J Health Sci**, v. 2, n. 2, p. 19-26, 2016.

PENHAVEL, Maria Vitória Carmo et al. Effects of carbon dioxide therapy on the healing of acute skin wounds induced on the back of rats. **Acta Cir. Bras**. São Paulo , v. 28, n. 5, p. 334-339, May 2013.

PIAZZOLLA, Luciana Paganini. **Estudo da evolução de úlceras vasculares sob a ação de carboxiterapia**. 2011. 65 f., il. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) - Universidade de Brasília, 2011.

SANTOS, M. F. S.; CZECHKO, N. G.; NASSIF, P.A.N.; FILHO, J.M.R.; ALENCAR, B.L.F.; MALAFAIA, O, et al. Avaliação do uso do extrato bruto de *Jatropha gossypifolia* L. na cicatrização de feridas cutâneas em ratos. **Acta Cir Bras**, v. 21, n. 3, p. 2-7, 2006.

SCHMIDT, J, MONNET, P, NORMAND, B, FABRY, R. Microcirculatory and clinical effects of serial percutaneous application of carbon dioxide in primary and secondary Raynaud's phenomenon. **Vasa**. 2005 May; 34(2):93-100.

SCORZA, Flavia Acedo; BORGES, Fabio Dos Santos. Carboxiterapia: uma revisão. **Revista Fisioterapia Ser** – Ano 3, n 4 – out/nov/dez – 2008.

SILVA, Taciane Stein da. Estudo microscópico da lesão tecidual em pele de ratos Wistar, tratados com laser de baixa potência. **R. bras. Bioci**. Porto Alegre, v. 8, n. 3, p. 264-267, jul./set. 2010.

SÖNMEZ, Ahmet et al. Carbon dioxide therapy increases capillary formation on random pedicled skin flaps in the rat. **Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery**, v. 62, n. 7, p. e236-e237, 2009.

MAIA-FIGUEIRÓ, A. ODASHIRO, G. MENEZES, L. COELHO, I. BREDA, B. SOUZA AND E. FIGUEIRÓ-FILHO, "Semi-Quantitative Histological Analysis of the Effect of Intense Pulsed Light (IPL) and Carbon Dioxide (CO<sub>2</sub>) Intradermic Injection on Fibroblast and Collagen Proliferation in the Skin of Wistar Rats," **Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications**, Vol. 2 No. 3, 2012, pp. 164-173. doi: [10.4236/jcdsa.2012.23032](https://doi.org/10.4236/jcdsa.2012.23032).

TAZIMA, M. DE F.; ANDRADE VICENTE, Y.; MORIYA, T. Biologia dea Ferida e Cicatrização. **Medicina** (Ribeirao Preto. Online), v. 41, n. 3, p. 259-264, 30 set. 2008.

TORYAMA, T *et al.* Effect of artificial carbon dioxide foot bathing on critical limb ischemia (Fontaine IV) in peripheral arterial disease patients. **Int Angiol.** 2002 Dec; 21(4): 367-73.

WOLLINA, U.; HEINIG, B.; UHLEMANN, C. Transdermal CO2 Application in Chronic Wounds. Case Reports. **Lower Extremity Wounds** 3(2); 2004.

WORTHINGTON, A, LOPEZ, JC. Carboxiterapia – Utilização do CO2 para Fins Estéticos. In: Yamaguchi C. **II Annual Meeting of Aesthetic Procedures**. São Paulo: Santos, 2006:567-71.

ZELINKOVÁ H. Carboxytherapy - a non-invasive method in aesthetic medicine and dermatology, and the combined usage of carboxytherapy and PRP in the periorbital area. **Glob Dermatol** 4, 2017. doi: 10.15761/GOD.1000202

ZWAAN W, KLOESS W, KAGEL C, KUMMER-KLOESS D, MATTHIES-ZWAAN S, SCHUTZ RM, WEISS HD. Carbon dioxide as an alternative contrast medium in peripheral angiography. **Rofo Fortschr Geb Rontgenstr Neuen Bildgeb Verfahr.** 1996 Aug; 165(2):180.

## APÊNDICE 1



## DECLARAÇÃO

Eu, Adriana Caroprezo Morini, declaro aceitar a orientação do trabalho intitulado **“EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO DE CARBOXITERAPIA E DE ULTRASSOM TERAPÊUTICO NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS EM RATOS”**, estando sob minha orientação o pesquisador assistente: Brenno de Sousa Ferreira, declarando ter total conhecimento do conteúdo desta pesquisa, para o qual dou meu aceite.

*Santarém - Pará, 04 de junho de 2017.*

A handwritten signature in blue ink, consisting of several loops and a long horizontal stroke, positioned above a horizontal line.

Assinatura

**ANEXO I: ACEITE CEUA**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ - UFOPA  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO TECNOLÓGICA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA/UFOPA

---

**DECLARAÇÃO**

Declaramos que o projeto intitulado “Efeitos da associação de carboxiterapia e de ultrassom terapêutico na cicatrização de feridas cutâneas em ratos”, protocolizado sob o número Nº 10014-2017, utilizando 60 (sessenta) animais, sob a responsabilidade do (a) professor (a) Adriana Caroprezo Morini, foi analisado e Aprovado por esta Comissão de Ética no Uso de Animais, da UFOPA.

Santarém, 13 de novembro de 2017.

  
Euclides Araújo Ribeiro  
Assistente em Administração  
SIAPG: 0191745

---

CEUA/UFOPA - instituída pela portaria nº 15 de 11 de janeiro de 2013 e credenciada junto ao Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA. Deferimento publicado no Diário oficial da União Nº 187, 26 de setembro de 2013. CIAEP: 01.0065.2013