

CÉLIA SAMPAIO COSTA

**Avaliação por processamento de imagem assistida
por computador das alterações citométricas dos
adipócitos do tecido celular subcutâneo da parede
anterior do abdome, após hipercapnia local**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Clínica Cirúrgica

Orientador: Prof. Dr. Nelson Fontana Margarido

**SÃO PAULO
2009**

DEDICATÓRIA

Ao meu pai, de quem herdei o hábito de acreditar.

À minha mãe, pequenina e forte, pura fibra.

À minha filha, Julia, que a cada dia é mais parecida com aquela que eu queria ser.

Ao meu filho, Guilherme, que tem o humor das pessoas fortes e a sagacidade dos que vencem na vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Aldo Junqueira Rodrigues Júnior, DD Chefe do Departamento de Cirurgia da FMUSP pela oportunidade.

Ao Prof. Dr. Paulo Andrade Lotufo, DD. Superintendente do Hospital Universitário da USP pela oportunidade.

Ao Prof. Dr. Nelson Fontana Margarido pela sua orientação, dedicação e empenho.

Ao Prof. Dr. José Pinhata Otoch, pela confiança, amizade e perseverança na idealização deste estudo.

Ao Prof. Dr. Maurício Seckler, DD. Presidente da Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da USP, pelas sugestões e empenho.

À Profa. Dra. Marília Cerqueira Leite Seelaender, pelo apoio e acolhimento.

Aos Professores Doutores Carlos Augusto Real Martinez e Denise Gonçalves Priolli, pelas fundamentais contribuições e sugestões.

Aos Professores Doutores Luiz Alberto Soares, Raul José Mauad Júnior e Linda Maximiliano Ferreira, pelas análises, sugestões e confiança.

Aos Doutores Alberto Eiger e Cláudio Donato pelo importante suporte técnico.

À Profa. Dra. Valéria Petri, pelo estímulo e incentivo.

Aos Doutores Miguel Luiz Batista Júnior e Rodrigo Xavier das Neves, integrantes do Laboratório de Gorduras do ICB da USP pela fundamental participação.

À Doutora Maria Lúcia Habib Paschoal, pela amizade e apoio incondicional.

Às Doutoradas Deborah Steinmetz Elias e Maria de Fátima dos Santos Costa Pallone pela amizade e apoio.

À Senhora Maria Helena Vargas, pelo trabalho, competência e dedicação na editoração da presente pesquisa.

À Eliane Falconi Mônico Gazetto, pelas orientações e importante auxílio nos difíceis caminhos da Pós-Graduação.

À Senhorita Valéria Vilhena Lombardi, pela ficha catalográfica e pesquisa bibliográfica.

Às Senhoras Wilma Monteiro Fresca, Inez de Oliveira Araújo e Simone Fascina Rodrigues da Costa, pelo papel fundamental no desenvolvimento do trabalho.

Aos funcionários: Sara Camargo Lima, Luciana Baldini Ferreira, Clementina Toledo de Souza, Messias Pereira de Abreu, Ivaneide Elisa da Silva, Jaqueline Cândido Pinto e Kelly Cristina da Silva, que caminharam sempre junto conosco nesta jornada.

Às voluntárias que integraram esta pesquisa.

Ao Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, local fundamental de minha complementação profissional.

Ao Laboratório de Gorduras do ICB da USP, pelo suporte técnico imprescindível para este estudo.

Às amigas de sempre Lucinda Mendes Santos, Beatrice YuenYee Tse e Eduarda Maria Santiago, pela grande amizade, apoio e compreensão em todos os momentos da minha jornada.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Júlia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas	
Lista de figuras	
Lista de tabelas	
Lista de gráficos	
Resumo	
Summary	
1 INTRODUÇÃO	01
2 OBJETIVOS	04
3 REVISÃO DA LITERATURA	06
4 MÉTODOS.....	12
4.1 Casuística.....	13
4.2 Procedimento Cirúrgico de Biópsia	22
4.3 Parâmetros estudados	24
4.3.1 Dados antropométricos iniciais	24
4.3.2 Parâmetros histológicos	25
4.3.3 Metodologia estatística.....	26
5 RESULTADOS.....	27
6 DISCUSSÃO	38
7 CONCLUSÕES	52
8 ANEXOS	54
9 REFERÊNCIAS	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- CAPPesq - Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CO₂ - Dióxido de carbono
CONEP - Comissão Nacional de Estudos e Pesquisas
HCO₃⁻ - Bicarbonato
HU/USP - Hospital Universitário da Universidade de São Paulo
IMC - Índice de Massa Corpórea
OMS - Organização Mundial de Saúde
SAC - Superfície de Área Corpórea
μm - Micrômetro [milionésimo do metro = (1 × 10⁻⁶ m)]

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Placa no chão com a paciente em várias posições.....	15
Figura 2 -	Demarcação do perímetro do acúmulo de gordura na parede anterior do abdome	16
Figura 3 -	Confecção do mapa individual da voluntária.....	16
Figura 4 -	Medida da circunferência abdominal passando pela cicatriz umbilical	17
Figura 5 -	Medida da circunferência abdominal passando pelos pontos mais altos da crista ilíaca ântero-superior	17
Figura 6 -	Foto do mapa com o perímetro da área de acúmulo de gordura e quadrado negro (10 x 10 cm) utilizado como referência para cálculo da área	19
Figura 7 -	(A) Demarcação dos pontos de infusão do CO ₂ no perímetro de acúmulo de gordura na parede abdominal anterior; (B) detalhe da mesma área	20
Figura 8 -	Campo cirúrgico delimitado.....	23
Figura 9 -	Aplicação de campo fenestrado e ressecção do espécime de pele e gordura.....	23
Figura 10 -	Sutura final do procedimento de biópsia	23
Figura 11 -	Microfotografias de cortes histológicos dos adipócitos corados por hematoxilina-eosina com aumento de 100x. (A) momento pré-tratamento; (A1) demarcação do perímetro dos adipócitos; (B) momento pós-tratamento e (B1) demarcação do perímetro dos adipócitos	37
Figura 12 -	Quadrado de com área de 100 cm ² com 25 pontos de punção para infusão de gás carbônico.....	46
Figura 13 -	Representação esquemática das elipses em escala dos adipócitos médios (A) nos momentos pré e pós e (B) superposição das respectivas elipses	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Idade, peso inicial e altura das voluntárias	28
Tabela 2 -	Índice de massa corpórea, superfície de área corpórea total e superfície de área tratada e porcentagem de área tratada.....	28
Tabela 3 -	Superfície de área tratada e volume de CO ₂ infundido.....	28
Tabela 4 -	Circunferência umbilical pré e pós-tratamento.....	29
Tabela 5 -	Circunferência da crista ilíaca pré e pós-tratamento.....	29
Tabela 6 -	Peso inicial e peso final	29
Tabela 7 -	Área dos adipócitos no pré e pós tratamento	30
Tabela 8 -	Diâmetro dos adipócitos no pré e pós tratamento.....	31
Tabela 9 -	Perímetro dos adipócitos no pré e pós tratamento	32
Tabela 10 -	Comprimento dos adipócitos no pré e pós tratamento	33
Tabela 11 -	Largura dos adipócitos no pré e pós tratamento	34
Tabela 12 -	Índice de elipticidade	35
Tabela 13 -	Número de células no pré e pós tratamento.....	36

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Área dos adipócitos no pré e pós tratamento.....	30
Gráfico 2 - Diâmetro dos adipócitos no pré e pós tratamento	31
Gráfico 3 - Perímetro dos adipócitos no pré e pós tratamento.....	32
Gráfico 4 - Comprimento dos adipócitos no pré e pós tratamento	33
Gráfico 5 - Largura dos adipócitos no pré e pós tratamento.....	34
Gráfico 6 - Índice de elipticidade.....	35
Gráfico 7 - Número de células no pré e pós tratamento	36

RESUMO

Costa CS. *Avaliação por processamento de imagem assistida por computador das alterações citométricas dos adipócitos do tecido celular subcutâneo da parede anterior do abdome, após hipercapnia local* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009.

Recentes estudos vêm demonstrando os efeitos benéficos da infiltração percutânea de dióxido de carbono em diferentes campos da Medicina, inclusive como alternativa para tratamento de depósitos localizados de gordura formados após lipoaspiração da parede abdominal. É possível que os efeitos dessa terapia encontrem-se relacionados à capacidade do método em aumentar a circulação sangüínea local, bem como aos efeitos lipolíticos do CO₂ sobre adipócitos do tecido envolvido. Entretanto, até a presente data, poucos estudos avaliaram os efeitos histológicos e citométricos sobre adipócitos, presentes no tecido subcutâneo da parede abdominal. O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da infusão de gás carbônico sobre a população e morfologia de adipócitos da parede abdominal. Quinze voluntárias, com média de idade de 34 anos, foram submetidas a sessões de infusão de CO₂ durante três semanas consecutivas (duas sessões por semana com intervalos de dois a três dias entre cada sessão). O volume de gás carbônico infundido por sessão, em pontos previamente demarcados, foi sempre calculado com base na superfície da área a ser tratada, com volume de gás de 250 mL/100 cm² de superfície tratada. Os pontos de infusão foram demarcados respeitando-se o limite eqüidistante de 2 cm entre eles. Em cada ponto de punção se injetou 10 mL, por sessão, mantendo-se fluxo de gás de 80 mL por minuto. Foram colhidos, por biópsia cirúrgica, fragmentos de tecido celular subcutâneo da região anterior da parede abdominal para estudo histológico antes e após tratamento. Os números e as alterações histomorfológicas nos adipócitos, tais como área, diâmetro médio, perímetro,

comprimento, largura e número de adipócitos por campos de observação foram mensurados por processamento de imagem assistida por computador, utilizando-se o programa Image-Pro-plus. Os resultados encontrados antes e após a infusão de gás carbônico foram analisados por meio de teste t pareado, adotando-se nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Encontrou-se redução significativa nos valores das variáveis histomorfológicas mensuradas após o uso da hipercapnia tais como redução de sua área ($p = 0,00001$), diâmetro ($p = 0,00001$), perímetro ($p = 0,00001$), comprimento ($p = 0,00001$), largura ($p = 0,00001$), observou-se maior espaçamento entre as mesmas e menor número de adipócitos por campo ($p = 0,00001$). Conclui-se que existe efeito na morfologia e população dos adipócitos do tecido adiposo subcutâneo após utilização terapêutica de hipercapnia.

Descritores: Adipócitos. Tela subcutânea. Processamento de imagem assistida por computador. Dióxido de carbono/uso terapêutico.

SUMMARY

Costa CS: *Analysis of adipocytes changes by computer-assisted imaging process in abdominal wall adipose tissue after local hypercapnia* [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009.

Recent researches have demonstrated the beneficial effects of percutaneous infiltration of carbon dioxide in different fields of medicine. Currently, this therapy proves to be an alternative for treatment of localized fat deposits formed after lipectomy of the abdominal wall. The effects appear to be related to the ability of therapy to increase local blood circulation and lipolytic effects of CO₂ on tissue involved. However few studies have evaluated histological and cytometric effects on subcutaneous adipocytes tissue subjected to this new therapeutic modality. The purpose of this study was to evaluate the effects of infusion of carbon dioxide on the population and morphology of adipocytes in the abdominal wall. Fifteen volunteers were subjected to sessions of CO₂ infusion for three consecutive weeks with two sessions per week at intervals of two to three days between each session. The volume of carbon dioxide infused per session, at points previously marked, was always based on the surface of the area to be treated with gas volume of 250 mL/100 cm² of surface treated. Areas were demarcated with the limit up to 2 cm equidistant between them. At each point of puncture was injected 10mL of CO₂, per session, keeping the gas flow of 80 mL/minute. Fragments of subcutaneous tissue of the anterior abdominal wall were collected by surgical biopsy for histological study before and after treatment. The numbers and histomorphological changes in adipocytes, such as area, diameter, perimeter, length, width and number of adipocytes per field of view were measured by image processing computer assisted using the program Image-Pro Plus. The results before and after the infusion of carbon dioxide were analyzed by paired t test. Significance level of 5% (p<0.05) was

adopted. A significant difference was found in the values of variables measured after the use of hypercapnia as reduction of its area ($p = 0,00001$), diameter ($p = 0.00001$), perimeter ($p = 0,00001$), length ($p = 0,00001$), width ($p = 0,00001$), greater spacing between them and lower number of adipocytes per field ($p = 0,00001$). It is concluded that there is effect of adipocyte morphology and population of the subcutaneous adipose tissue after therapeutic use of hypercapnia.

Descriptors: Adipocytes. Subcutaneous tissue. Image processing, computer-assisted. Carbon dioxide/therapeutic use.

1 INTRODUÇÃO

No início da década de 1930, observações iniciais no Balneário Termal de Royat (França) constataram que o simples banho com águas saturadas com gás carbônico apresentava melhoras em doenças inflamatórias e isquêmicas, conseqüência do aumento da circulação local (Brandi *et al.* 2004).

No início da década de 1950, não só a aplicação local, mas principalmente a infusão de gás carbônico no subcutâneo, por meio de agulhas (Di Ció e Klein, 1950; Ito *et al.*, 1989), promoviam melhora da circulação com liberação de maior quantidade de oxigênio para os tecidos envolvidos.

Os efeitos terapêuticos seriam conseqüentes à vasodilatação local, com queda da resistência vascular periférica, propiciando melhor circulação local. Essa vasodilatação, tanto arterial quanto venosa, propiciaria aumento do fluxo sangüíneo, que inclusive foi comprovado por estudos com doppler fluxometria (Diji, 1959; Volkmer, 1991).

A infusão de gás carbônico no tecido subcutâneo acarreta aumento da temperatura local (Diji e Greenfield, 1960); enquanto que outras misturas gasosas não interferem com esta variável térmica.

Ainda dentro das observações clínicas e já em pleno século XXI, verificaram a ação do dióxido de carbono sobre gorduras localizadas (Brandi *et al.*, 2001). Esses estudos sugerem possíveis alterações histológicas, sem contudo analisarem os efeitos reais.

Brandi *et al* (2004) indicaram a infusão de gás carbônico no subcutâneo como medida alternativa a ser associada a procedimentos de lipoaspiração como complemento terapêutico coadjuvante com o objetivo de solucionar acúmulos localizados de tecido gorduroso e ou irregularidades cutâneas decorrentes deste procedimento cirúrgico.

Tavares-Ferreira (2007) apresentou 21 casos clínicos, com documentação fotográfica, de efeitos benéficos da infusão de gás carbônico na pele e subcutâneo de pacientes que apresentavam deficiência de circulação local e conseqüente dificuldade de cicatrização de feridas, comprovando melhoras dos quadros iniciais.

Em 2008, Tavares-Ferreira *et al.* destacaram a dificuldade do encontro na literatura mundial de pesquisas sobre carboxiterapia (infusão de gás carbônico no tecido subcutâneo), que destacassem ou explicassem os efeitos histológicos deste método terapêutico.

Na literatura existe absoluta carência de estudos cientificamente conduzidos, demonstrando os diferentes efeitos da hipercapnia local, principalmente no que se refere aos aspectos citométricos.

2 OBJETIVOS

A presente pesquisa tem por escopo avaliar alterações morfológicas na população de adipócitos de áreas de gordura localizada na parede anterior do abdome, após sessões controladas de infusões percutâneas de gás carbônico medicinal; verificando se existe ação efetiva, quais modificações, quanto à citometria e número das células gordurosas analisadas.

3 REVISÃO DA LITERATURA

A presente pesquisa é uma contribuição ao estudo dos efeitos da infusão de dióxido de carbono (CO₂) no plano subcutâneo do abdome e eventuais repercussões sobre diferentes aspectos histológicos.

Existem interesses crescentes nos estudos terapêuticos que solucionem problemas envolvendo a pele humana e o tecido celular subcutâneo adjacente.

Diversos estudos morfológicos e de mudanças estruturais da pele e subcutâneo, são constantemente relatados com o intuito da obtenção da cura de patologias que alteram por completo esses tecidos (Kede e Sabatovich, 2004).

Considerando que a infusão de gás carbônico no subcutâneo é uma dessas soluções alternativas, e que se trata de tema com escassa quantidade de trabalhos científicos (Tavares-Ferreira *et al.*, 2008), esta revisão será específica e objetiva, contemplando tópicos correlatos com obediência à cronologia.

Na França, em 1932, no Balneário Termal de Royat, começaram estudos sobre os efeitos do gás carbônico inicialmente na superfície cutânea, com o objetivo terapêutico de aumentar a circulação local e melhorar doenças inflamatórias e isquêmicas (Brandi *et al.*, 2004).

Posteriormente Di Ció e Klein (1950) demonstraram que não só a utilização na superfície cutânea, bem como realizando infusão no subcutâneo

de gás carbônico era benéfico em pacientes hipertensos com vasculopatia periférica. Essa terapia promoveu, na grande maioria dos pacientes, diminuição numérica da pressão sistólica mediana e mínima, tendendo à normalização de seus valores; enquanto que nos pacientes normotensos com vasculopatias periféricas, não ocorreram grandes modificações, embora o índice oscilométrico e a pressão diferencial aumentaram na maioria. Nos pacientes hipotensos com vasculopatias periféricas, aumentaram todos os valores na maioria dos casos, concluindo-se desta forma que o método exerceu ação normalizadora da pressão arterial.

Na literatura, os trabalhos de Di Ció (1956) mostraram que o volume inicial ou mínimo de gás a ser infundido, para certeza de efeito terapêutico, era de 250 mL de gás por dia. Existem, no entanto, outras pesquisas sugerindo doses limites de gás carbônico diárias de 20 a 800 mL (Badal, 1956; Gensch, 1989; Jonderko *et al.*, 1990; Taubert, 1991).

Diferentes autores demonstraram em trabalhos clínicos e experimentais, que o simples banho em águas saturadas com gás carbônico era suficiente para promover a vasodilatação local, com conseqüente queda da resistência vascular periférica, proporcionando melhor circulação local. Essa vasodilatação local era tanto arterial quanto venosa, o que foi evidenciado em trabalhos experimentais com o auxílio de Doppler-fluxometria, que revelou o aumento do fluxo sanguíneo (Diji, 1959; Colin *et al.* 1978; Ito *et al.*, 1989; e Volkmer, 1991).

Diji e Greenfield (1960) constataram aumento local da temperatura da pele de aproximadamente 1,5 °C, após infusão no subcutâneo de mistura

gasosa de 50% de CO₂/N₂O ou 100% de CO₂; enquanto que insuflações isoladas de N₂O, ar ou ciclopropano, não promoveram alteração da temperatura local.

A infusão de gás carbônico no subcutâneo promove enfisema gasoso por período de tempo aproximado de três a cinco minutos, acompanhado por eritema regional da pele (Großhans, 1984; Taubert, 1991) Este método terapêutico pode ser realizado através da punção da pele com agulhas bem finas para minimizar os efeitos dolorosos (Heinicke, 1985; e Volkmer, 1992).

Contra indicações absolutas da utilização da infusão de gás carbônico no subcutâneo não são reportadas (Heinicke, 1985 e Taubert, 1991).

Heinicke (1985) e Taubert (1991) destacaram o baixo custo deste método terapêutico e no mesmo trabalho Taubert esclareceu que na eventualidade de pacientes que apresentassem diástases hemorrágicas e ou uso de terapia de anti-coagulação, esta modalidade terapêutica não estaria recomendada; e ainda afirmou que a infusão de gás carbônico contaminado poderia constituir-se em complicação severa pelo uso deste método.

Quanto à periodicidade e a duração do tratamento à base de infusão de CO₂, vários autores sugeriram aplicações em séries, em dias alternados, pelo prazo de dois a três semanas ou ainda maiores, de acordo com avaliações clínicas obtidas ao longo da evolução dos mesmos (Großhans e Gensch, 1987; Gensch, 1989; Taubert, 1989; Steuber, 1990; e Volkmer, 1992).

As possibilidades de fenômenos alérgicos são de baixa intensidade com este método terapêutico (Großhans e Gensch, 1987).

A incidência de complicações fatais com o uso de infusão de gás carbônico no subcutâneo é estimada entre 0,002% e 0,59% (Lantz e Smith, 1994; Wolf Jr. *et al.*, 1994).

Vik e Tesar (1988) constataram acentuada hipercapnia e acidose no local de infusão do CO₂, conseqüentes ao aumento da produção de bicarbonato (HCO₃⁻) e aumento do fluxo sangüíneo local.

Na literatura quando se refere a gás carbônico medicinal, trata-se de sua forma pura contendo menos de 5% em volume de Nitrogênio, Argônio, Hélio, Oxigênio, Hidrogênio, H₂S ou CH₄ (Tesar, 1989; Taubert, 1991).

O número consecutivo de tratamentos clínicos com tal método, segundo Volkmer e Strobel, 1990, podia variar de cinco a 20 aplicações.

Inúmeras são as evidências da ação positiva da infusão de gás carbônico próxima a lesões dermatológicas (Jonderko *et al.*, 1990; Volkmer, 1991; Tavares-Ferreira, 2007).

O embolismo com gás carbônico foi reportado em cirurgias vídeo-laparoscópicas, geralmente com completa recuperação clínica (Moskop Jr. e Lubarsky, 1994). Estas evidências são válidas para cirurgias em que se utilizam trocateres e punção acidental direta de vasos calibrosos com os mesmos, fazendo-se infusão de elevados volumes de gás carbônico diretamente na corrente sangüínea.

Savin *et al.* (1995) mostraram efeitos vasomotores benéficos obtidos pela aplicação de gás carbônico em pacientes com arteriopatias periféricas obliterantes.

Brockow *et al.* (2000) realizaram uma revisão sistemática dos efeitos clínicos da infusão de gás carbônico no subcutâneo. Reuniram 13 trabalhos científicos escritos em inglês, tchecoslovaco e alemão de autores da Europa Central, e concluíram pela eficácia clínica deste método terapêutico.

Brandi *et al.*(2001) demonstraram em estudo clínico e correlações anátomo-patológicas, que o tratamento com infusão de dióxido de carbono em gorduras localizadas poderia promover a ruptura dos adipócitos.

O método terapêutico foi avaliado por alguns autores com o uso da Doppler-fluxometria revelando o aumento da circulação local, e sugerindo a necessidade de futuros estudos histológicos (Brandi *et al.* 2004). Nesse mesmo estudo, os autores indicaram o método para tratamento de irregularidades cutâneas conseqüentes à lipoaspiração, considerando-o como complemento terapêutico coadjuvante para a obtenção de melhores resultados, visando à solução para acúmulos localizados de tecido gorduroso.

Tavares-Ferreira (2007) apresentou 21 casos clínicos com documentação fotográfica do efeito positivo da carboxiterapia (infusão de gás carbônico na pele e subcutâneo) utilizada em pacientes com deficiência de circulação local e dificuldade de cicatrização de feridas.

Tavares-Ferreira *et a.* (2008) ressaltaram a dificuldade de encontro na literatura mundial de publicações científicas sobre carboxiterapia, e mostraram, experimentalmente em ratos, a indução do aumento do ciclo do colágeno em feridas, com o uso da infusão de gás carbônico no tecido celular subcutâneo.

4 MÉTODOS

O protocolo desta pesquisa foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo - Registro CEP-HU/USP: 857/08 - SISNEP CAAE: 0067.0.198.000-08, cuja cópia encontra-se no Anexo A.

Todo o desenvolvimento do estudo foi submetido e aprovado pela Comissão Nacional de Estudos e Pesquisas (CONEP), cuja cópia do protocolo de entrega encontra-se no Anexo B.

4.1 Casuística

A casuística foi constituída por 15 voluntárias, provenientes preferencialmente do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, do sexo feminino, com Índice de Massa Corpórea (IMC) de 20 a 25 (SAUDÁVEL), e que se enquadraram dentro dos critérios de inclusão, com o objetivo de tornar homogêneo o grupo de mulheres.

Critérios de inclusão:

- a) Voluntária do sexo feminino
- b) Índice de Massa Corpórea entre 20 e 25
- c) Idade entre 24 e 50 anos
- d) Não menopausadas

- e) Sem apresentarem sinais e sintomas de doenças metabólicas e ou auto-imunes
- f) Sem uso de terapia de reposição hormonal
- g) Com área de acúmulo de gordura localizada na parede anterior do abdome
- h) Sem terem sido submetidas à cirurgia bariátrica ou plástica abdominal
- i) Sem sinais de lipodistrofia
- j) Não gestantes ou lactantes
- k) Sem lesões dermatológicas na pele da parede anterior do abdome
- l) Voluntárias no decorrer do tratamento não ganharam ou perderam mais de dois quilos de peso corpóreo.

Todas as voluntárias assinaram Termo de Consentimento Informado, cujo teor completo encontra-se no Anexo C.

Após serem selecionadas, as voluntárias foram submetidas às seguintes etapas seqüenciais:

a) Medidas do peso corpóreo em quilogramas, e da altura em metros

b) Cálculo do IMC, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS)

$$\text{IMC} = \text{peso} \div \text{altura}^2$$

c) Documentação fotográfica da região abdominal: plano frontal, oblíqua direita, perfil direito, oblíqua esquerda, perfil esquerdo; segundo esquematização indicada no solo (Figura 1) e sempre com a mesma distância focal.

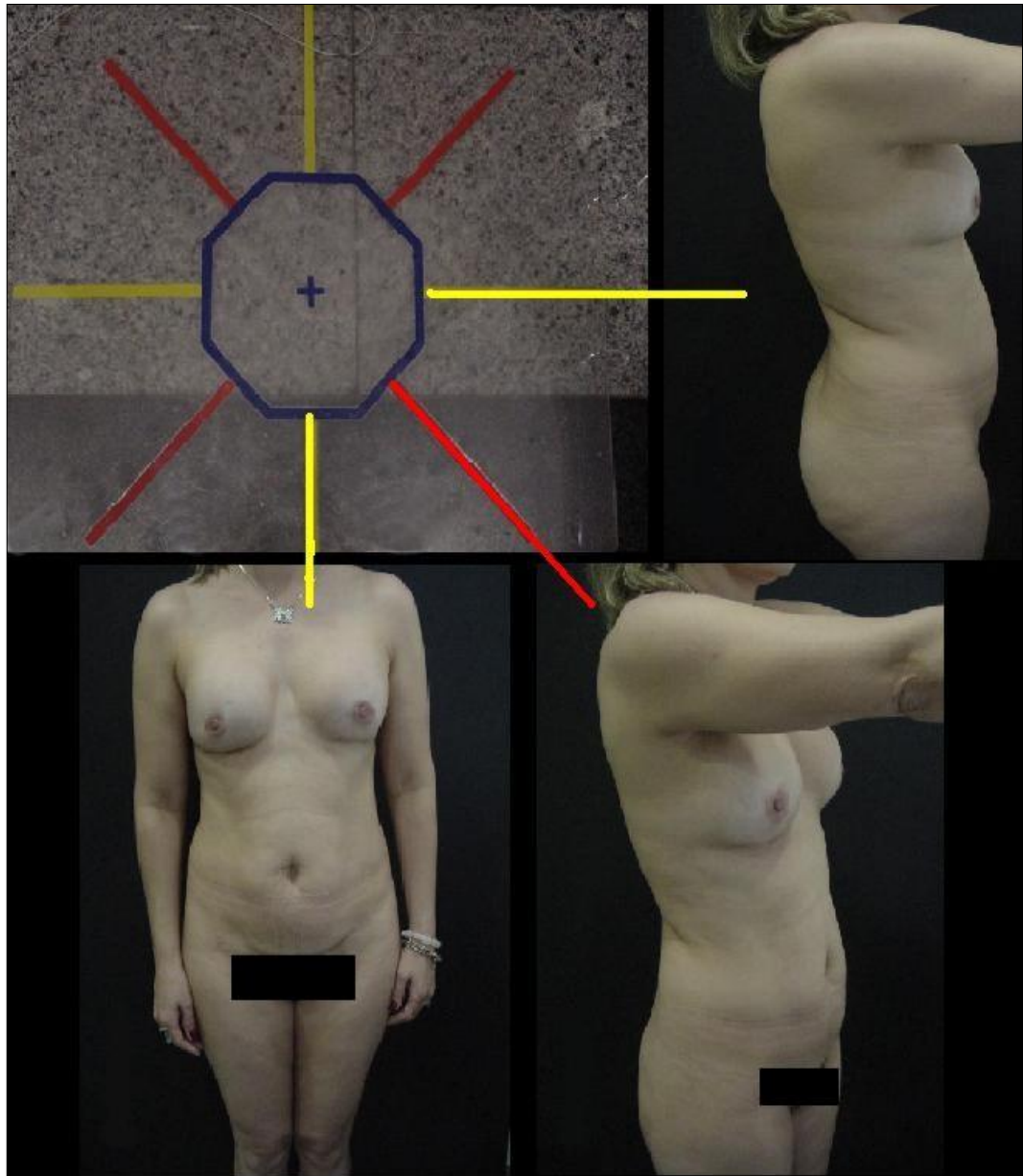


Figura 1 - Placa no chão com a paciente em várias posições

d) Delimitação e mapeamento do perímetro da área com acúmulo localizado de gordura na parede anterior do abdome (Figuras 2 e 3).



Figura 2 - Demarcação do perímetro do acúmulo de gordura na parede anterior do abdome



Figura 3 - Confecção do mapa individual da voluntária

e) Medidas das circunferências abdominais, a primeira pela cicatriz umbilical, e a segunda passando pelo ponto mais alto das cristas ilíacas ântero-superior direita e esquerda. A paciente permanecia em posição ortostática e ambas as circunferências eram aferidas em planos paralelos ao solo. Essas medidas antropométricas sempre foram realizadas pelo mesmo profissional e com a mesma fita métrica (Figura 4 e 5)

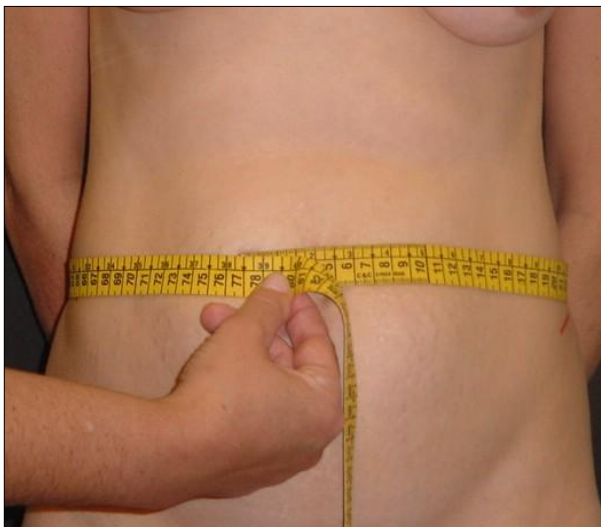


Figura 4 - Medida da circunferência abdominal passando pela cicatriz umbilical



Figura 5 - Medida da circunferência abdominal passando pelos pontos mais altos da crista ilíaca ântero-superior

f) Cálculo da Superfície de Área Corpórea (SAC) total em metros quadrados, segundo a seguinte fórmula (Guyton *et al.*, 1973):

$$\text{SAC} = K \cdot p^{2/3}$$

Onde:

K = constante igual a 0,09

p = peso corpóreo em quilograma (kg)

g) Cálculo de área de acúmulo localizado de gordura na parede anterior do abdome a ser tratada pela infusão de gás carbônico em números absolutos (em centímetros quadrados) e percentagem (%) em relação à SAC total. Para cada voluntária, foi confeccionado mapa de delimitação da área a ser tratada com CO₂, através do meio de correspondência fotográfica, com análise computadorizada das imagens¹.

Os mapas individuais das áreas de acúmulo de gordura na face anterior do abdome foram fotografadas, tendo ao lado um quadrado negro de 10 X 10 centímetros = 100 cm², cuja imagem servia de parâmetro na hora da digitalização das imagens, com a mesma distância fixa do objeto.

As imagens obtidas pela câmera digital foram transferidas para um computador, e com a ajuda de um programa de análise de imagens² (Wilcox *et al.*, 2008), as diferentes áreas a serem tratadas com CO₂ foram calculadas. A medida do quadrado negro de 10 X 10 cm serviu como base para o cálculo da área em centímetros quadrados e sua percentagem.

Cada cálculo de área foi obtido após a mensuração da área a ser submetida a infusão gás carbônico, sempre pelo mesmo pesquisador (Figura 6).

¹ Câmera fotográfica SONY Cyber Shot 2,1 mega pixels Digital Still Câmera DSC - S 50

² IMAGE TOOL UTHSCSA. The University of Texas Health Science Center in San Antonio, 1995-2002.



Figura 6 - Foto do mapa com o perímetro da área de acúmulo de gordura e quadrado negro (10 x 10 cm) utilizado como referência para cálculo da área

h) Cálculo do volume de gás carbônico a ser infundido por sessão na área de acúmulo localizado de gordura na parede anterior do abdome: a referência utilizada foi o trabalho de Di Ció (1956), com a informação de que o volume mínimo necessário para se obter efeito terapêutico é de 250 mL de gás carbônico.

Para cada paciente se encontrava o volume aproximado através do produto da área a ser tratada $\times 250 \div 100$.

Quanto ao FLUXO e TEMPO DE INFUSÃO do gás carbônico, os parâmetros adotados foram de 80 mL/min e isso conferia o tempo máximo de oito segundos de infusão gasosa em cada ponto de punção³.

³ Carbtek Advanced - Carbtek CO₂ Infusion Advanced - Estek

i) Biópsia do tecido celular subcutâneo PRÉ-TRATAMENTO, em área de acúmulo localizado de gordura na parede anterior do abdome. Nessa área específica, de acúmulo localizado de gordura, padronizou-se o local desse procedimento cirúrgico: com base na cicatriz umbilical, estando a paciente em decúbito dorsal horizontal, sempre 3 cm para a direita, encontrava-se o local da parede abdominal, onde se realizou a biópsia de pele e tecido celular subcutâneo antes do início das aplicações de gás carbônico.

j) Demarcação dos locais de infusão de CO₂ medicinal na área a ser tratada: paciente em decúbito dorsal horizontal, com o auxílio do mapa individual, com o perímetro da área de acúmulo localizado de gordura na face anterior do abdome, realizava-se nova demarcação dessa área. Com a mesma caneta própria para marcação de pele, foram assinalados dentro desse perímetro, pontos equidistantes entre si, de 2 cm, para marcar os locais de punção com agulha, para infusão do CO₂ (Figura 7).

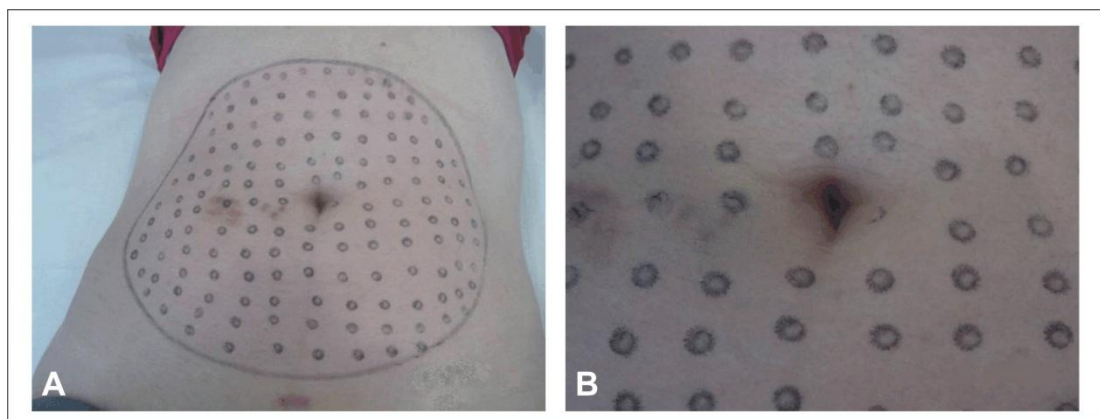


Figura 7 - (A) Demarcação dos pontos de infusão do CO₂ no perímetro de acúmulo de gordura na parede abdominal anterior; (B) detalhe da mesma área

k) Punção e infusão do CO₂ no subcutâneo: a paciente permanecia em decúbito dorsal horizontal. Realizava-se antissepsia com solução alcoólica de clorexidina⁴. Com a agulha de calibre 30 G^{1/2}⁵, puncionava-se a pele e alcançava-se o subcutâneo em cada ponto previamente demarcado. Realizava-se em todas as demarcações a infusão de aproximadamente 10 mililitros de gás carbônico medicinal, completando-se assim o volume destinado àquela área.

l) Número e intervalo de sessões de infusão de gás carbônico medicinal: as aplicações eram feitas duas vezes por semana, num total de 6 sessões, com intervalos de dois a três dias entre as mesmas (segundas e quintas feiras ou terças e sextas feiras).

m) Biópsia de tecido celular subcutâneo PÓS-TRATAMENTO: sete dias após a última sessão de CO₂, procedeu-se do mesmo modo da primeira biópsia, apenas distanciando-se em direção caudal, 1 cm da primeira biópsia.

⁴ Riohex - Industria Farmacêutica Rioquímica Ltda.

⁵ BD

4.2 Procedimento Cirúrgico de Biópsia

Tanto na realização da biópsia de celular subcutâneo PRÉ-TRATAMENTO, quanto na de PÓS-TRATAMENTO, a seqüência técnica foi a mesma, com exceção do local de realização.

Paciente em decúbito dorsal horizontal. Antissepsia com solução alcoólica de clorexidina. Anestesia local com lidocaína a 2% sem vasoconstrictor⁶, nas regiões escolhidas para as biópsias PRÉ ou PÓS-TRATAMENTO. Nova antissepsia com clorexidina alcoólica. Colocação de campo fenestrado estéril. Incisão com bisturi descartável, lâmina N° 15, desenhando-se um fuso de 3 X 2 mm, interessando pele e tecido celular subcutâneo. Exérese do fuso de pele e gordura. Colocação da peça cirúrgica em frasco específico, contendo paraldeído 4, onde o espécime permanecia no máximo por 24 horas; sendo em seguida transferido para outro frasco contendo álcool a 70 %. Sutura do subcutâneo com ponto simples e nó invertido com fio cirúrgico de poligalactina 910⁷ de calibre 5-0. Sutura de pele com pontos intra-dérmicos com fio cirúrgico de náilon⁸ de calibre 6-0. Curativo da pele com micropore estéril⁹.

Os pontos cirúrgicos de náilon foram retirados no oitavo dia de pós-operatório e novo curativo com micropore estéril, foi realizado, com o objetivo de não alargar a cicatriz resultante (Figuras 9 e 10).

⁶ Xylestesin a 2 % - Cristália

⁷ Polivycril - Ethicon

⁸ Ethicon

⁹ 3 M do Brasil

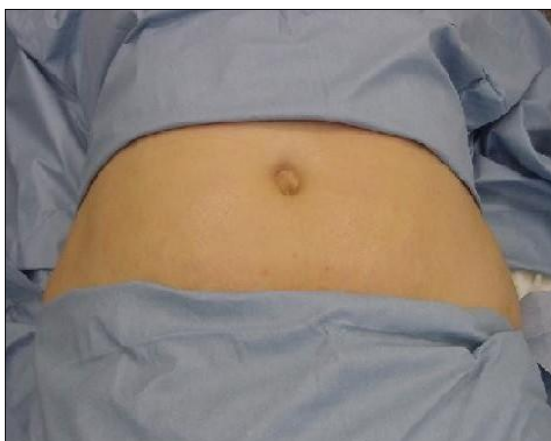


Figura 8 - Campo cirúrgico delimitado



Figura 9 - Aplicação de campo fenestrado e ressecção do espécime de pele e gordura



Figura 10 - Sutura final do procedimento de biópsia

4.3 Parâmetros estudados

4.3.1 Dados antropométricos iniciais

Inicialmente foram efetuadas aferições antropométricas, tais como peso inicial em quilogramas, altura em metros, circunferências abdominais no nível da cicatriz umbilical e do ponto mais alto das cristas íliaco ântero-superior.

Com base nessas medidas, foram calculados os IMC e SAC, estas em metros quadrados.

Foram mapeados individualmente os perímetros da área de acúmulo localizado de gordura na face anterior de todas as voluntárias. Com auxílio de fotografias e análise de imagens por computador, calculou-se a área, em centímetros quadrados, das áreas de acúmulo adiposo a serem tratadas, e a correspondente porcentagem (%) em relação à SAC total. Com essas informações foi possível calcular o volume de CO₂ medicinal a ser infundido no subcutâneo, em cada sessão de tratamento.

Com a coleta de todos esses dados antropométricos das voluntárias, ao lado das idades e informações anamnéticas, pode se averiguar, se todas se enquadravam dentro dos Critérios de Inclusão, previamente padronizados.

Após sete dias da última sessão de infusão de CO₂, foram realizadas novas medidas antropométricas: peso final, circunferências abdominais (cicatriz umbilical e cristas ílicas ântero-superiores), bem como realizados novos estudos fotográficos individuais.

4.3.2 Parâmetros histológicos

As peças cirúrgicas obtidas pelos processos de biópsia (PRÉ e PÓS-TRATAMENTO) foram preparadas em blocos de parafina, e realizados cortes para lâminas histológicas, e submetidas à coloração com hematoxilina-eosina (Bancroft e Stevens, 1977), e análise ao microscópio óptico comum.

Em cada lâmina foram analisados seis campos, para estudos citométricos do tecido adiposo, estudando-se a área, diâmetro médio, perímetro, comprimento e largura do adipócito. Estas mesmas informações já foram empregadas nos estudos de Bing *et al.* (2006) e Bing e Trayhurn (2008).

Calculado o número de células estudadas em cada campo de observação das lâminas obtidas por biópsias de tecido gorduroso de cada voluntária no pré e pós tratamento.

Calculou-se o índice de elipticidade dos adipócitos envolvidos no estudo, por meio da razão: C/L (C= comprimento e L= largura).

Todos os dados antropométricos individuais, parâmetros histológicos e eventuais intercorrências durante as sessões de infusão de gás carbônico medicinal foram anotadas em planilhas específicas.

4.3.3 Metodologia estatística

Considerando que os resultados medidos e ou calculados apresentaram distribuição normal, optou-se pelo teste de “t” de Student pareado, uma vez que os dados se referem sempre a uma mesma paciente em dois momentos diferentes (pré e pós tratamento), ou seja, amostras relacionadas.

As variações dos resultados das medidas antropométricas foram submetidas ao teste de Kruskal-Wallis.

Sempre que a análise estatística permitiu concluir pela existência de diferença estatisticamente significativa, o valor correspondente ao teste empregado foi anotado e destacado por um asterisco (*).

O grau de significância estabelecido foi de 5% ($P < 0,05$) (Rosner, 1995).

5 RESULTADOS

Os resultados antropométricos estão apresentados nas Tabelas de 1 a 6.

Tabela 1 - Idade, peso inicial e altura das voluntárias

	Média	Desvio Padrão
Idade (anos)	34,00	± 7,25
Peso inicial (kg)	58,87	± 5,62
Altura (m)	1,61	± 0,06

Tabela 2 - Índice de massa corpórea, superfície de área corpórea total e superfície de área tratada e porcentagem de área tratada

	Média	Desvio Padrão
IMC	22,58	± 1,78
Superfície de área corpórea total (m ²)	1,61	± 0,10
Superfície de área tratada (cm ²)	449,26	± 175,17
Porcentagem de área tratada	2,69	± 1,07

Tabela 3 - Superfície de área tratada e volume de CO₂ infundido

	Média	Desvio Padrão
Superfície de área tratada (cm ²)	449,26	± 175,17
Volume de CO ₂ infundido (mL)	1126,00	± 437,21

Tabela 4 - Circunferência umbilical pré e pós-tratamento (cm)

	Média	Desvio Padrão
Pré-tratamento	83,17	± 7,88
Pós-tratamento	80,73	± 8,06

Teste de Kruskal-Wallis (p = 0,31)

Tabela 5 - Circunferência da crista ilíaca pré e pós-tratamento (cm)

	Média	Desvio Padrão
Pré-tratamento	88,17	± 6,82
Pós-tratamento	86,00	± 6,86

Teste de Kruskal-Wallis (p = 0,32)

Tabela 6 - Peso inicial e peso final

	Média	Desvio Padrão
Peso inicial (kg)	58,87	± 5,62
Peso final (kg)	58,20	± 5,71

Teste de Kruskal-Wallis (p = 0,64)

Resultados das imagens avaliadas por computador, dos efeitos da carboxiterapia sobre os adipócitos encontram-se nas Tabelas de 7 a 13 e Gráficos de 1 a 7).

Nas tabelas que se seguem são representados os resultados do teste t de Student pareado, uma vez que, os dados se referem às mesmas voluntárias, em dois momentos diferentes, ou seja, amostras relacionadas.

Tabela 7 - Área dos adipócitos no pré e pós tratamento (em μm)

	Pré-tratamento	Pós-tratamento
Voluntárias	15	15
Média	5349,00	2992,79
Desvio Padrão	$\pm 677,99$	$\pm 765,52$
Erro Padrão	175,05	197,65
t de Student	7,1315	
Grau de liberdade	14	

P = 0,00001 (área pós-tratamento é significativamente menor que a área pré-tratamento)
IC_{95%} = 1647,50 a 3064,90

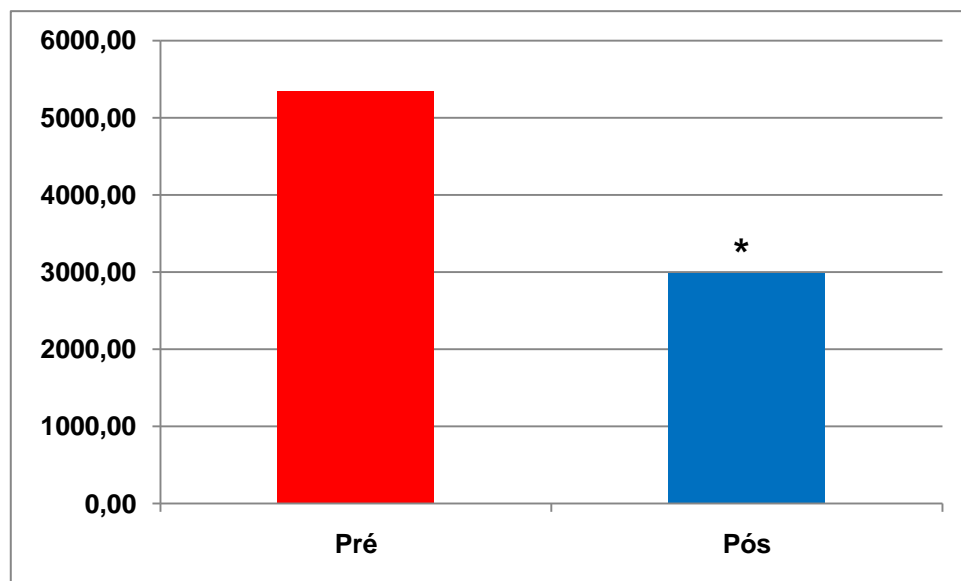
Gráfico 1 - Área dos adipócitos no pré e pós tratamento (em μm)

Tabela 8 - Diâmetro dos adipócitos no pré e pós tratamento (em μm)

	Pré-tratamento	Pós-tratamento
Voluntárias	15	15
Média	78,22	56,00
Desvio Padrão	$\pm 5,28$	$\pm 5,53$
Erro Padrão	1,36	1,42
t de Student	9,3332	
Grau de liberdade	14	

P = 0,00001 (diâmetro pós-tratamento é significativamente menor que a área pré-tratamento)
IC_{95%} = 17,1184 a 27,3349

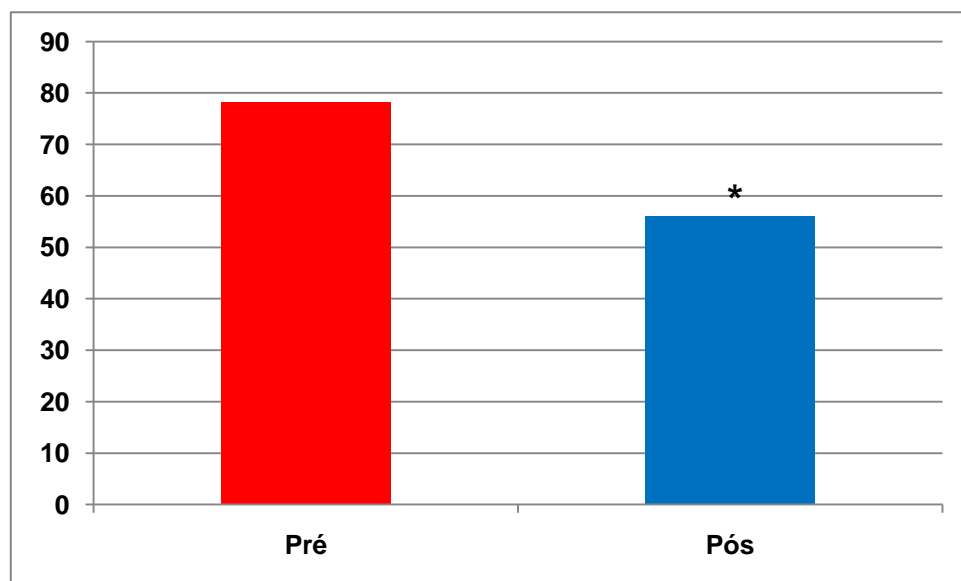
Gráfico 2 - Diâmetro dos adipócitos no pré e pós tratamento (em μm)

Tabela 9 - Perímetro dos adipócitos no pré e pós tratamento (em μm)

	Pré-tratamento	Pós-tratamento
Voluntárias	15	15
Média	268,82	188,50
Desvio Padrão	$\pm 22,82$	$\pm 34,07$
Erro Padrão	5,89	8,79
t de Student	6,02	
Grau de liberdade	14	

P = 0,00001 (perímetro médio pós-tratamento é significativamente menor que a área pré-tratamento)

IC_{95%} = 51,7212 a 108,9188

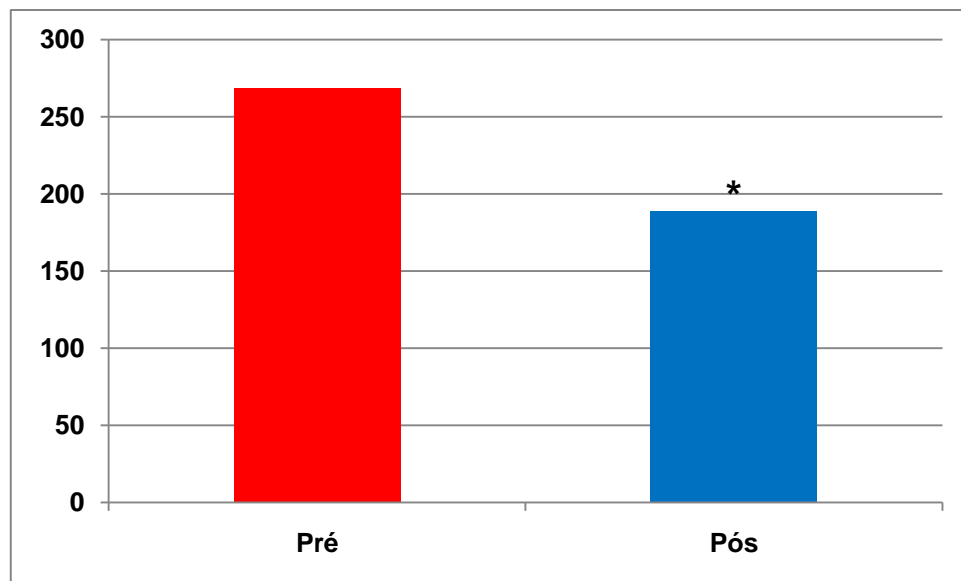
Gráfico 3 - Perímetro dos adipócitos no pré e pós tratamento (em μm)

Tabela 10 - Comprimento dos adipócitos no pré e pós tratamento
(em μm)

	Pré-tratamento	Pós-tratamento
Voluntárias	15	15
Média	96,81	68,48
Desvio Padrão	$\pm 6,39$	$\pm 11,77$
Erro Padrão	1,65	3,03
t de Student	6,5582	
Grau de liberdade	14	

P = 0,00001 (comprimento médio pós-tratamento é significativamente menor que a área pré-tratamento)

IC_{95%} = 19,0663 a 37,6004

Gráfico 4 - Comprimento dos adipócitos no pré e pós tratamento
(em μm)

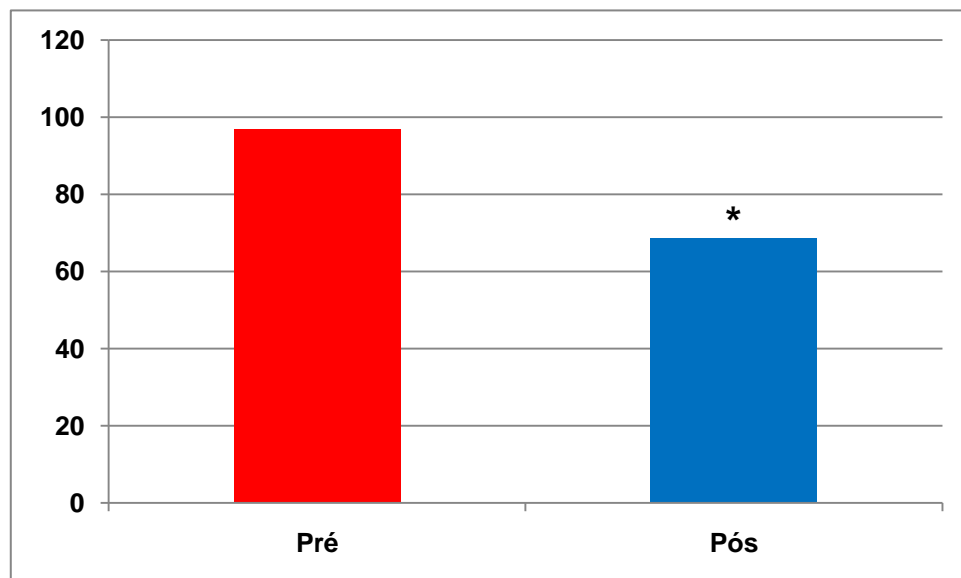


Tabela 11 - Largura dos adipócitos no pré e pós tratamento (em μm)

	Pré-tratamento	Pós-tratamento
Voluntárias	15	15
Média	71,50	46,30
Desvio Padrão	$\pm 7,24$	$\pm 11,85$
Erro Padrão	1,86	3,06
t de Student	5,7263	
Grau de liberdade	14	

P = 0,00001 (largura médio pós-tratamento é significativamente menor que a área pré-tratamento)

IC_{95%} = 15,7604 a 34,6396

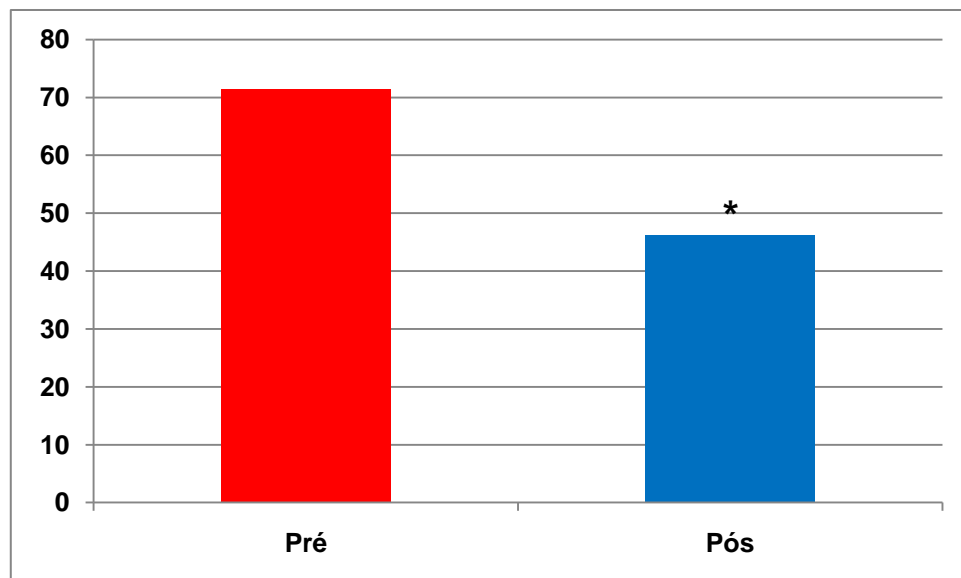
Gráfico 5 - Largura dos adipócitos no pré e pós tratamento (em μm)

Tabela 12 - Índice de elipticidade (comprimento/largura)

Pré-tratamento	Pós-tratamento
1,35	1,48

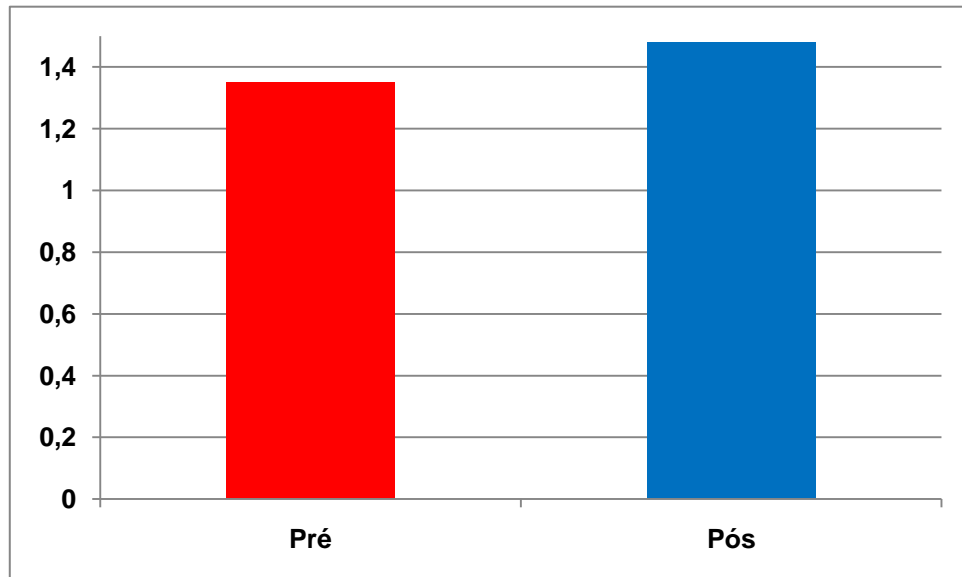
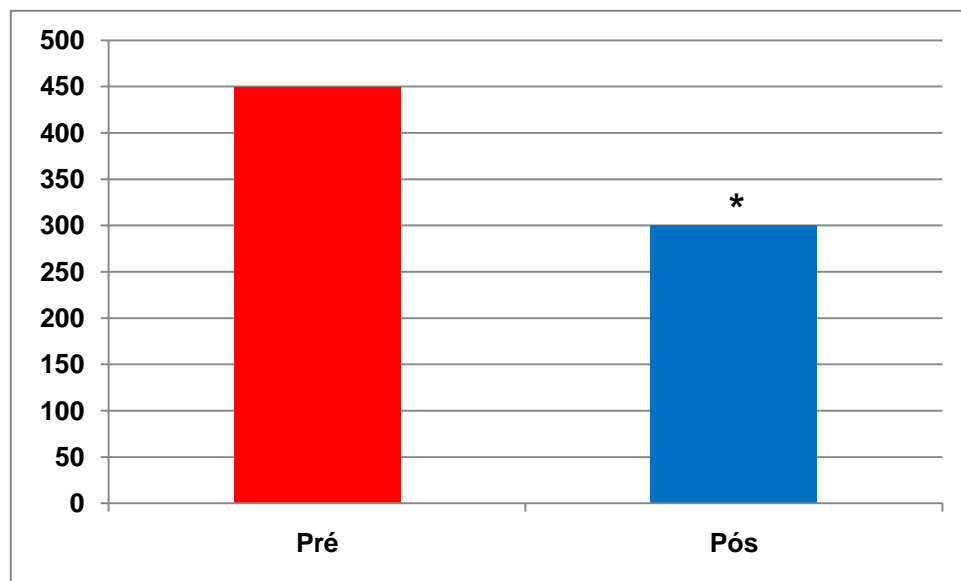
Gráfico 6 - Índice de elipticidade (comprimento/largura)

Tabela 13 - Número de células no pré e pós tratamento

	Pré-tratamento	Pós-tratamento
Voluntárias	15	15
Média	449,00	300,13
Desvio Padrão	± 42,94	± 18,16
Erro Padrão	11,08	4,69
t de Student	12,5696	
Grau de liberdade	14	

P = 0,00001 (número de células médio pós-tratamento é significativamente menor que a área pré-tratamento)

IC_{95%} = 123,4626 a 174,2707

Gráfico 7 - Número de células no pré e pós tratamento

Resultados histológicos

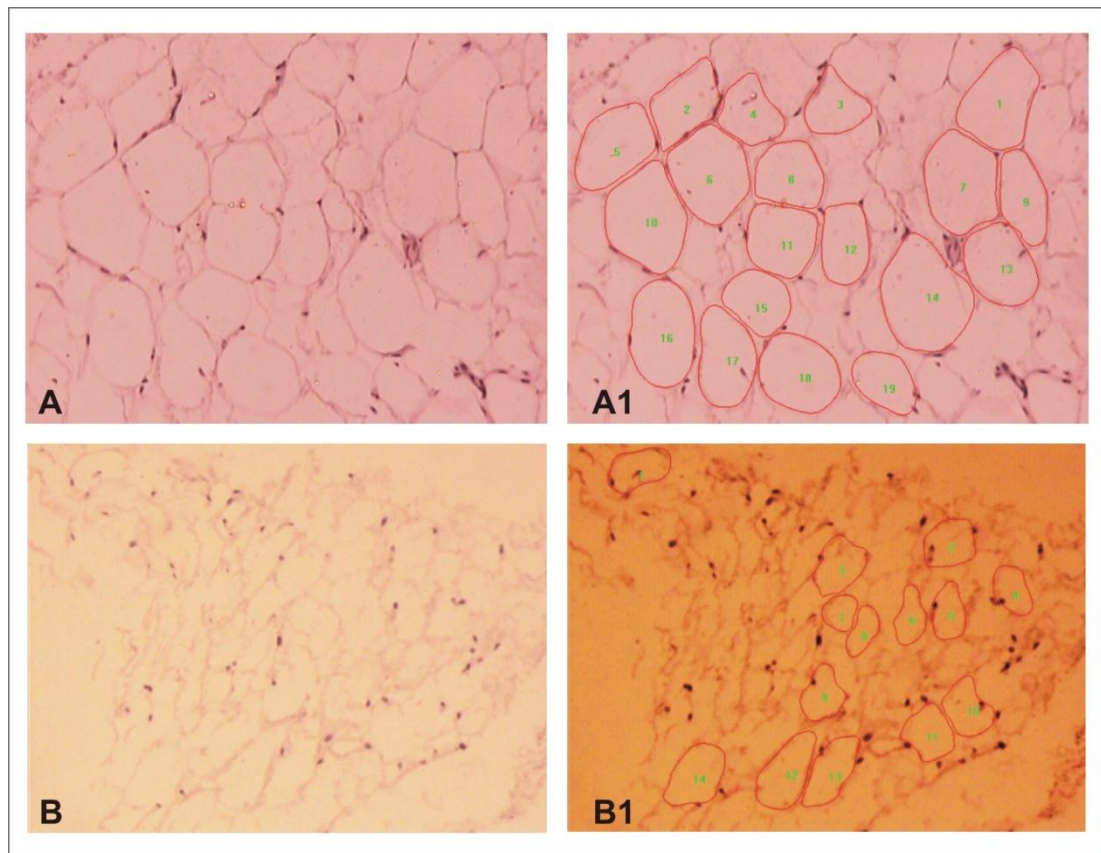


Figura 11 - Microfotografias de cortes histológicos dos adipócitos corados por hematoxilina-eosina com aumento de 100x. (A) momento pré-tratamento; (A1) demarcação do perímetro dos adipócitos; (B) momento pós-tratamento e (B1) demarcação do perímetro dos adipócitos

6 DISCUSSÃO

Há oito décadas que se sabe de efeitos benéficos da carboxiterapia (infusão de gás carbônico medicinal nos tecidos cutâneo e subcutâneo) como método terapêutico, entretanto, desconhece-se os reais mecanismos desses efeitos, principalmente os relativos a aspectos histológicos (Brockow *et al.*, 2000).

Outro ponto contraditório dessa alternativa medicinal é a falta de padronização da sua utilização como método terapêutico auxiliar em diversas doenças. Este fato torna difícil, senão impossível, a comparação científica de diferentes trabalhos constantes na literatura científica mundial (Tavares-Ferreira, 2007).

Estes tópicos, acima destacados, foram preponderantes na escolha do tema da presente pesquisa e tornou-se um desafio o estabelecimento de padrões bem definidos da aplicação desse método, possibilitando no futuro o correto cotejamento de dados referentes a essas pesquisas.

A casuística do presente estudo foi constituída pelo conjunto de 15 voluntárias. As voluntárias precisaram satisfazer todos os critérios de inclusão pré-estabelecidos. Com essa postura procurou-se constituir conjunto uniforme e homogêneo; conferindo assim maior confiança e credibilidade aos resultados obtidos.

O índice de massa corpórea entre 20 e 25, foi escolhido, por caracterizar a condição denominada, por definição de saudável. A média do IMC de todas as voluntárias integrantes desta pesquisa foi, no início de 22,58; ou seja, bem no meio do intervalo proposto.

A faixa etária de 24 a 50 anos, com idade média de 34 anos, contempla mulheres adultas, em plena idade produtiva, e que obrigatoriamente não estivessem na menopausa, não estarem amamentando, não estarem grávidas, e não fazendo uso de reposição hormonal; portanto, fora de possíveis interferências da ação de cargas hormonais, que pudessem interferir no metabolismo orgânico, com efeitos não controláveis sobre o tecido adiposo.

A casuística foi composta por mulheres saudáveis, com peso corpóreo inicial médio de 58,87 quilos, no entanto, com área de acúmulo de gordura localizado na tela celular subcutânea da parede anterior do abdome. Essa característica da localização do tecido adiposo, garante a certeza de se estar pesquisando sempre fatos ocorridos num mesmo tipo de gordura, e em área do corpo humano de fácil delimitação, mensuração e controle. Trata-se de um acúmulo adiposo, no entanto, em mulheres saudáveis.

Essa área do corpo das voluntárias, não poderia apresentar lesões dermatológicas, e muito menos ter sido sede de manipulações decorrentes de cirurgia plástica. Do mesmo modo, as cirurgias bariátricas poderiam causar efeitos em diferentes sistemas e órgãos, podendo acarretar efeitos não totalmente conhecidos, e que influiriam nos resultados deste estudo.

Finalmente, ainda dentro dos critérios de inclusão, as voluntárias não poderiam durante todo o desenrolar da pesquisa, ganharem ou perderem mais do que dois quilos de peso corpóreo, pois variações superiores a esse intervalo, influenciariam também os resultados encontrados.

A partir dessas premissas, procurou-se correlacionar a área de acúmulo localizado na parede anterior do abdome com outros parâmetros antropométricos, além do IMC; e a idéia foi estabelecer correlações entre a extensão da superfície da área a ser tratada com a infusão de gás carbônico medicinal, com a SAC total. Com o auxílio dos estudos de fisiologia humana, recorreu-se a fórmula proposta por Guyton *et al.* (1973), para se estimar essa área em metros quadrados.

Com o perímetro demarcado da área de acúmulo de gordura na parede anterior do abdome, confeccionou-se mapas individuais dessa demarcação, e com a estratégia de se fotografar essa área, e ao mesmo tempo com um quadrado preto de 10 X 10 cm, tendo sempre a mesma distância focal, conseguia-se assim calcular, com exatidão, a área de acúmulo de gordura com o auxílio de um programa de análise de imagens (IMAGE TOOL UTHSCSA), estratégia já utilizada com sucesso entre nós por Mauad Júnior (2003). A partir do conhecimento da área a ser tratada, pode-se calcular o volume de gás carbônico a ser infundido por sessão.

De posse das áreas de superfície corpórea total, e área da superfície a ser tratada com CO₂ medicinal, foi calculada a porcentagem dessa segunda superfície em relação à superfície corpórea total.

Com posse dessas informações, e com a proposta de se infundir sempre 250 mL de gás carbônico medicinal para cada 100 cm² de área a ser tratada, tinha-se um referencial preciso para o volume individual de gás a ser infundido por sessão, para cada voluntária.

Para se assegurar infusões eqüidistantes, e volumes iguais por ponto de punção, demarcou-se com caneta própria de marcação cirúrgica, os pontos eqüidistantes, 2 cm entre si, conforme está documentado nas Figuras 7 e 8.

Em cada ponto demarcado, com auxílio de agulha fina, para minimizar ao máximo o desconforto causado pela punção, bem como a possibilidade de eventuais acidentes de punção; sempre com a observância de todos os princípios de antissepsia e assepsia, realizava-se cada infusão de gás. Empregou-se o equipamento Carbtek Avanced com função manual, com fluxo de até 150 mL/min; regulado para um fluxo de 80 mL/min. Como em cada ponto o volume a ser infundido foi de 10 mL, o tempo médio da duração da infusão foi de sete a oito segundos cada um.

Com todos esses cálculos, equipamento, fluxo e tempo, conseguia-se com bastante segurança a infusão sempre do mesmo volume de gás por ponto de aplicação.

Os intervalos entre as sessões foram de dois a três dias, num total de seis, ou seja, duração de três semanas.

Durante cada infusão, sempre realizada, pela autora, a inspeção macroscópica da pele do local foi absolutamente rigorosa. Do mesmo modo que o relatado na literatura (Großhans, 1984; Taubert, 1991), quando da

infusão do gás, constatava-se discreto e fugaz eritema regional da pele; e sinais mínimos de enfisema, que duravam no máximo de três a cinco minutos, e com total remissão macroscópica, após esse intervalo de tempo.

Em todas as sessões de infusão de gás carbônico, as voluntárias relatavam de modo espontâneo, que o desconforto doloroso era absolutamente suportável e desprezível.

Outro aspecto de relevante menção foi que ao longo das seis sessões de infusão percutânea de gás carbônico, todas as voluntárias não apresentaram reações alérgicas ou qualquer outro sinal sugestivo de complicações. Como os próprios trabalhos de Lantz e Smith (1994), e Wolf Jr. *et al.* (1994) demonstraram que a incidência de complicações fatais com o uso de infusão de gás carbônico é extremamente baixa, inclusive sendo este gás escolhido como o gás ideal para procedimentos vídeo-laparoscópicos e cirurgias cardíacas, com abertura das câmaras do coração. Os efeitos deletérios de infusão de gás carbônico ocorrem em uma incidência tão baixa que se permite a infusão deste gás próxima a áreas com nítidas lesões dermatológicas (Jonderko *et al.*, 1990; Volkmer, 1991; Tavares-Ferreira, 2007).

As únicas intercorrências dignas de nota foram discretas e raras equimoses. É importante ressaltar que nunca se observaram hematomas.

Outro fato que reforça a segurança do uso do gás carbônico na clínica diária, é que o mesmo pode ser usado como alternativa de contraste radiológico em angiografias, tanto em infusão contínua, quanto em “boulos” (Zwaan *et al.* 1996 ; Lang *et al.* 1999).

As infusões de gás carbônico medicinal possuem ainda outro fator de atração para seu emprego na prática clínica; trata-se de produto de baixo custo econômico, conforme já salientaram Heinicke (1985) e Taubert (1991).

Quanto a parâmetros antropométricos, as circunferências abdominais pré e pós-tratamento, tanto ao nível da cicatriz umbilical, quanto dos pontos mais altos das cristas ilíacas ântero-superiores, observou-se que apenas uma voluntária (n° 2) manteve a mesma dimensão da circunferência umbilical, enquanto que duas voluntárias (n° 2 e 3) ao nível das cristas ilíacas ântero-superiores as medidas se mantiveram inalteradas. Todas as demais medidas, no pós-tratamento diminuíram de 1 a 4,5 cm.

No presente estudo foi tentada a utilização de ultrassonografias para medição da espessura da tela subcutânea na área estudada, apesar de ter sido feita com o mesmo aparelho de ultra-som e pelo mesmo profissional com longa experiência clínica na área, estas informações foram inconclusivas, e portanto, nesta avaliação esses dados foram descartados, uma vez que os resultados não foram reprodutíveis, ao contrário do relatado por Fong *et al.* (1997).

Quanto a variação do peso corpóreo entre o início e o fim do estudo, pode se observar que 10 voluntárias diminuíram de peso; 2 (n° 7 e 15) mantiveram o peso, e 3 (n° 8, 10 e 14) aumentaram. Estes acontecimentos mostraram que as voluntárias de número 8 e 14, apesar de terem engordado apenas 1 kg, estas elevações mudaram seus IMC, para 25,53 e 25,14 respectivamente. Todas as demais voluntárias mantiveram seus IMC dentro da faixa pré-estabelecida. Estas duas medidas superiores de IMC foram de

pequena monta, e não invalidam a homogeneidade da casuística do presente estudo.

A partir de trabalhos pioneiros de Di Ció (1956), foi induzido que haveria a necessidade de um volume mínimo de gás carbônico a ser infundido, para se alcançar efetiva ação terapêutica.

No descompasso da revisão da literatura os volumes de gás carbônico infundidos contemplavam sugestões de doses diárias que variavam de 20 a 800 mL (Badal, 1956; Gensch, 1989; Jonderko, 1990; Taubert, 1991).

Foi Di Ció, em 1956, quem explicitou, de uma forma destituída de padrões científicos, que o volume mínimo de gás carbônico a ser infundido para certeza de efeito terapêutico era de 250 mL. Neste trabalho o autor não faz menção à área de tecido corpóreo que era contemplada com este volume.

Outro tópico absolutamente pertinente é a periodicidade e a duração do tratamento para a obtenção de resultados efetivos. Nas revisões realizadas por Großhans e Gensch (1987), Gensch (1989), Taubert (1989), Steuber (1990) e Volkmer (1992) que focalizaram estudos realizados na Europa Central; estes diferentes autores sugeriram aplicações de séries em dias alternados pelo prazo de duas a três semanas, e que não tinham dúvida de poder prolongar essas infusões de acordo com as evoluções clínicas observadas ao longo dos mesmos.

Portanto, a duração e os intervalos entre as sessões não obedeceram qualquer padrão. Tanto é verdade que Volkmer e Strobel, em 1990,

informaram que o número consecutivo de tratamentos poderia variar de cinco a 20 sessões, destituído de informações científicas que justificassem essa enorme variação.

Na presente pesquisa o volume de gás carbônico infundido por sessão foi estabelecido com rigor científico baseado na extensão da superfície corpórea a ser tratada. Procurou-se ter controle fácil e rigoroso do volume a ser infundido, chegando-se a estimativa de 10 mL para cada ponto de punção, o que configurava para uma área de 4 cm². Esses números estão em consonância com as afirmações aleatórias de Di Ció (1956), e que se mostraram eficientes em experiências clínicas prévias. Estes fatos permitem concluir que para cada 100 cm² de área a ser tratada, o volume adotado para eficiência terapêutica deveria ser de 250 mL, ou apenas 10 cm³ para cada local de punção, guardando-se a equidistância entre os diferentes pontos de punção de 2 cm. Para uma compreensão melhor do que se acabou de expor criou-se a Figura 12, em que se tem um quadrado de 10 cm de lado (100 cm² de área) que dividido de centímetro em centímetro possibilitou a identificação de 25 pontos possíveis de punção, equidistantes entre si de dois centímetros.

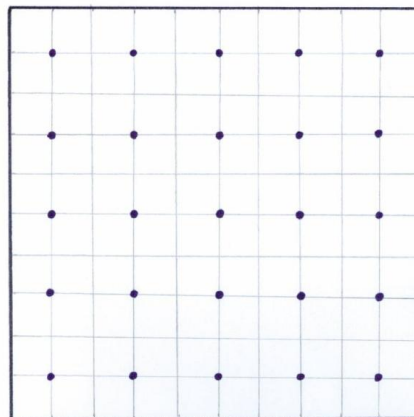


Figura 12 - Quadrado de com área de 100 cm² com 25 pontos de punção para infusão de gás carbônico

Optou-se pela periodicidade de seis sessões com intervalos mínimos de dois dias, e máximo de três dias para se compor o tratamento ao longo dos sete dias da semana, perfazendo-se um total de três semanas. Trata-se de período curto de tempo (21 dias ou três semanas), porém fixo.

O controle do volume de infusão de gás carbônico por ponto de punção era rigorosamente estabelecido de 10 cm³, para se obter resultado clínico com a correspondência histológica ao final do tempo total de tratamento.

Esta padronização confere confortável controle de 10 cm³ por ponto demarcado em toda a área delimitada cujo perímetro indicado nos mapas individuais das diferentes voluntárias, perímetro este indicado e demarcado pelo exame clínico da área de acúmulo de tecido gorduroso na parede anterior do abdome, com a voluntária em posição ortostática e copiada no mapa com a voluntária em posição de decúbito dorsal horizontal.

Nesta casuística, segundo os critérios de inclusão, não se incluíram voluntárias com lesões dermatológicas nas áreas estudadas.

Ainda dentro das considerações genéricas sobre a presente pesquisa é importante ressaltar que as observações clínicas referem-se a apenas um único tipo de tecido gorduroso, e localizado sempre na mesma região corporal, e que por definição, apresentava-se como acúmulo definido, em voluntárias consideradas saudáveis, e em condições clínicas definidas segundo a obediência aos critérios de inclusão.

Os estudos histológicos foram realizados no Laboratório de Gorduras do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, por

profissionais especializados na referida matéria, inclusive utilizando-se metodologia similar a importantes centros de pesquisa mundiais (Bing *et al.*, 2006; Bing e Trayhm, 2008).

Considerando-se que a amostra foi constituída por voluntárias saudáveis, os estudos histológicos pré tratamento, comprovaram dados de normalidade, o que conferiu maior segurança para a afirmação de ser uma casuística inicial composta por voluntárias com saúde e dentro dos padrões de normalidade.

Todas as voluntárias foram submetidas às seis sessões de infusão de gás carbônico medicinal no subcutâneo, com padrões absolutamente similares (seis sessões ao longo de 21 dias, com aplicações eqüidistantes conforme o mapeamento individual).

Os resultados estatísticos de igualdade, obtidos pela aplicação do teste de Kuskal-Wallis nos dados antropométricos, nos momentos pré e pós-tratamento, evidenciaram que as regiões alvo das aferições foram as mesmas.

Os estudos histológicos pós tratamento evidenciaram alterações citométricas dos adipócitos, com absoluta uniformidade com relação a área, diâmetro médio, perímetro, comprimento, largura e a razão comprimento/largura, que informa o índice de elipticidade.

Com auxílio de do programa Honestech TVR 2.5 foram realizadas microfotografias das laminas histológicas das amostras de tecido gorduroso nos momentos pré e pós tratamento, com coloração de hematoxilina-eosina. As imagens obtidas foram submetidas a estudos com o auxílio do programa

Image-Pró Plus 6.0, e com o auxílio do computador foi possível a quantificação precisa dos dados citométricos dos adipócitos, nos dois momentos distintos da presente pesquisa (pré e pós tratamento). Assim foi possível tratar os resultados com estudos estatísticos, que revelaram através estudo de “t” de Student pareado (para amostras correlacionadas), as seguintes diferenças: para todos os parâmetros citométricos, constatou-se diminuição dos valores estatisticamente significantes.

Quanto a área dos adipócitos, no momento pós tratamento ocorreu diminuição de 44,06 %; o diâmetro médio diminuiu de 20,45 %; o perímetro diminuiu de 29,87 %; o comprimento das células diminuiu de 29,26 %; e, a largura diminuiu de 35,24 %. Portanto, os adipócitos sob a ação da infusão de gás carbônico medicinal diminuíram significativamente de tamanho.

O índice de elipticidade, que é a razão do comprimento pela largura celular, no entanto aumentou de 9,62 %.

Para se ter melhor noção dessa relação gráfica, desenhou-se, em escala, as áreas elípticas médias dos adipócitos nos momentos pré e pós-tratamento (Figura 13 A). Na Figura 13 B ambas as elipses foram superpostas e constatou-se que os adipócitos após as seis seções de infusão de gás carbônico, são representadas por área significativamente menor; no entanto, ambas as elipses são proporcionais.

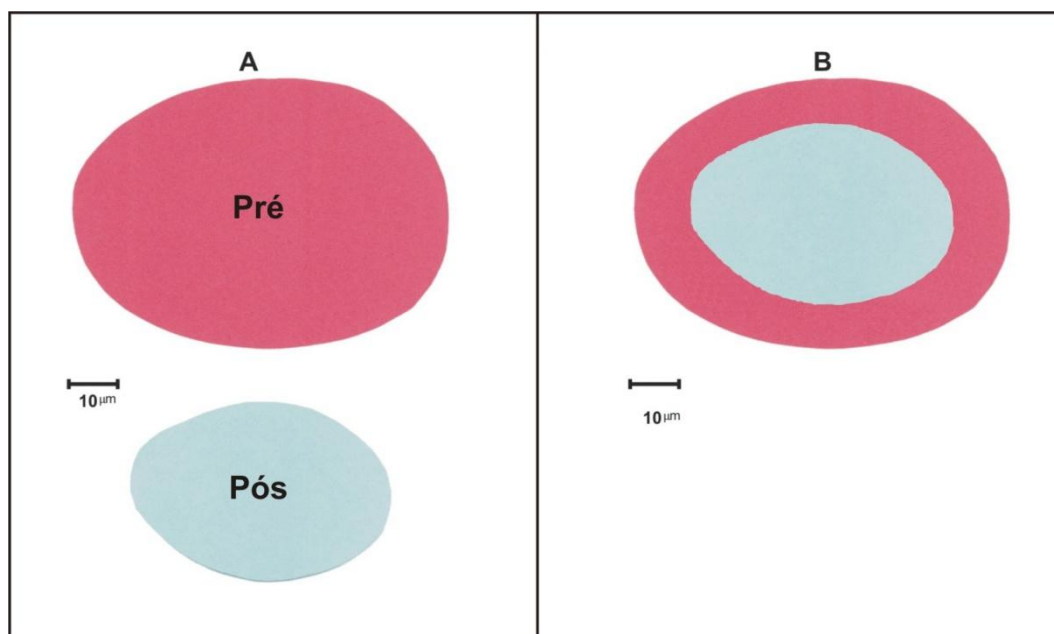


Figura 13 - Representação esquemática das elipses em escala dos adipócitos médios (A) nos momentos pré e pós e (B) superposição das respectivas elipses

O número de células gordurosas estudadas pelo mesmo número de campos de observação, diminuiu de um terço (33,18 %), essa incongruência aparente é explicada pelo maior espaçamento entre os adipócitos, como se pode ser observado na Figura 11.

Portanto, nas condições da presente pesquisa, pode-se afirmar que a infusão de CO₂ no volume, fluxo, tempo, em seis sessões com intervalos de dois a Três dias, teve a capacidade de diminuir os dados citométricos dos adipócitos envolvidos nesse tipo de terapia gasosa.

A lógica manda imaginar que os efeitos observados no presente estudo devem ter duração finita, ou seja, serem temporários. Surgem então as indagações de que se essa conduta terapêutica pode ser repetida na mesma área, e com que intervalo isto é possível. Essas respostas só poderão ser alcançadas com a associação das observações clínicas a novos estudos.

Outros questionamentos que precisam ser respondidos são relativos à transposição destes resultados para pacientes que não se enquadrem dentro dos critérios de inclusão estabelecidos nesta pesquisa.

É fundamental saber no futuro se esta terapêutica alternativa pode e deve ser aplicada em diferentes profundidades do corpo humano, ou seja, acúmulos de gordura com significativas espessuras, e ou também em localizações viscerais (Wajchenberg *et al.*,2002).

O tecido gorduroso é fundamentalmente um depósito de triacilgliceróis, apresentando características diferentes conforme sua localização no organismo, todavia, na atualidade existem evidências experimentais, que indicam que os adipócitos produzem e secretam substâncias como hormônios e citocinas, altamente ativas, com receptores específicos, e de importância fisiológica, atuando como verdadeiro órgão endócrino (Garcia *et al.*, 2002; Costa e Duarte, 2006).

No futuro, pesquisas bem conduzidas, precisarão ser realizadas, para evidenciar, se a infusão de gás carbônico medicinal, interfere ou não nestas recentes descobertas.

Trata-se de campo de estudo fértil, com perspectivas amplas, promissoras e quem sabe, inatingíveis com os limites atuais dos conhecimentos disponíveis.

7 CONCLUSÕES

Nas condições da presente pesquisa pode-se concluir que:

a) A infusão de gás carbônico no tecido subcutâneo tem condições de promover alterações citométricas nos adipócitos envolvidos.

b) As alterações citométricas manifestam-se como diminuição significativa da área, diâmetro médio, perímetro, comprimento e largura dos adipócitos estudados.

c) O número e o tamanho dos adipócitos diminuem após a ação do gás carbônico.

8 ANEXOS

Anexo A - Aprovação da CAPPesq - HU/USP

São Paulo, 17 de outubro de 2008.

Ilmo(a). Sr(a).

Prof. Dr. Nelson Fontana Margarido

Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

REFERENTE: **Projeto de Pesquisa** “Estudo do efeito da hipercapnia local no tratamento de gordura localizada. Estudo clínico-laboratorial” – **Pesquisador(a) Executante:** Célia Sampaio Costa - **Registro CEP-HU/USP:** 857/08 – **SISNEP CAAE:** 0067.0.198.000-08

Prezado(a) Senhor(a)

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, em reunião ordinária realizada no dia 17 de outubro de 2008, analisou o Projeto de Pesquisa acima citado, considerando-o como **APROVADO, bem como o seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.**

Lembramos que cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final, em função da duração da pesquisa), de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, item IX.2.c.

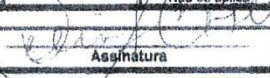
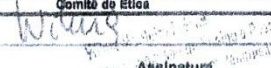
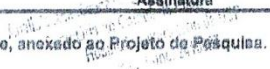
O primeiro relatório está previsto para 17 de outubro de 2009.

Atenciosamente,


Dr. Mauricio Seckler
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital Universitário da USP

Anexo B - Aprovação do CONEP

 **MINISTERIO DA SAUDE**
Conselho Nacional de Saude
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

PROJETO RECEBIDO NO CEP		CAAE - 0067.0.198.000-08	
Projeto de Pesquisa Estudo do efeito da hipercalemia local no tratamento de gordura localizada. Estudo clinico-laboratorial			
Área(s) Temática(s) Especial(s) Não se aplica		Grupo	Fase Não se aplica
CPF 01989008868		Pesquisador Responsável Nelson Fontana Margarido	
		Assinatura 	
		Comitê de Ética 	
Data de Entrega 17/10/2008	Recebimento: 		

Este documento deverá ser, obrigatoriamente, anexado ao Projeto de Pesquisa.

<http://portal.saude.gov.br/sisnep/cep/caac.cfm?VCOD=224301>

17/10/2008

Anexo C - Dados gerais das voluntárias

Nº	Paciente	Idade (anos)	Altura (m)	Peso inicial (kg)	IMC (peso/alt²)	Área de superfície corpórea (m²)
1	P. A. S.	27	1,58	62,00	24,83	1,63
2	M. A. S.	39	1,55	56,00	23,30	1,54
3	N. L. F. O.	50	1,62	62,00	23,62	1,66
4	N. O. C.	24	1,70	60,00	20,76	1,69
5	S. R. J. K.	42	1,72	72,00	24,33	1,85
6	S. F. P.	30	1,65	56,00	20,56	1,63
7	C. L. S.	24	1,69	57,50	20,13	1,60
8	C. B.	36	1,52	58,00	24,88	1,54
9	V. R.	28	1,58	56,00	22,43	1,56
10	L. M. A.	31	1,68	61,00	21,60	1,69
11	A. F. L.	37	1,60	62,50	24,00	1,64
12	C. T. S.	34	1,55	49,00	20,39	1,45
13	I. S. C.	32	1,60	53,00	20,70	1,54
14	R. V. M.	34	1,62	65,00	24,76	1,68
15	V. A. O. S.	42	1,54	53,00	22,34	1,50

Nº	Área de superfície tratada (cm²)	% da Área tratada	Voloume de CO₂ infundido por seção (mL)
1	304,49	1,86	770
2	38,84	2,85	1100
3	440,78	2,65	1100
4	436,26	1,44	1090
5	737,73	3,99	1850
6	531,20	3,26	1330
7	330,20	2,06	830
8	671,74	4,36	1680
9	196,93	1,26	500
10	391,72	2,31	980
11	494,96	3,02	1240
12	315,37	2,17	790
13	186,56	1,21	470
14	758,66	4,51	1900
15	503,39	3,33	1260

Nº	Circunferência umbilical (cm)		Circunferência crista ilíaca AS (cm)	
	Pré	Pós	Pré	Pós
1	88,00	86,00	97,00	96,00
2	80,00	80,00	83,00	83,00
3	95,00	94,00	96,00	96,00
4	78,00	75,00	89,00	86,00
5	93,00	90,00	97,00	93,00
6	80,50	75,00	86,00	82,00
7	70,00	67,00	76,00	74,00
8	93,00	90,00	95,00	94,00
9	78,00	75,00	81,00	79,00
10	83,00	81,00	85,00	83,00
11	90,00	87,00	93,50	91,00
12	74,00	73,00	81,00	79,00
13	77,00	74,00	86,00	83,00
14	91,00	89,00	94,00	90,00
15	77,00	75,00	83,00	81,00

9 REFERÊNCIAS

Badal J. Therapeutic use of gas from mineral springs. *Sb Lek.* 1956; 58(1):1-24.

Bancroft JD, Stevens A. *Theory and practice of histological techniques.* Churchill Livingstone, 1977.

Bing C, Russell S, Becket E, Pope M, Tisdale MJ, Trayhurn P, Jenkins JR. Adipose atrophy in cancer cachexia: morphologic and molecular analysis of adipose tissue in tumor-bearing mice. *Brit J Cancer.* 2006; 95:1028-37.

Bing C, Trayhurn P. Regulation of adipose tissue metabolism in cancer cachexia. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2008; (11):201-7.

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

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

Brockow T, Hausner T, Dillner A, Resch KL. Clinical evidence of subcutaneous CO₂ insufflations: a systematic review. *J Altern Complement Med.* 2000; 6(5):391-403.

Colin C, Lagneaux D, Lecomte J. Local vasodilating effects of carbon dioxide on cutaneous blood vessels (author's transl). *J Belge Med Phys Rehabil.* 1978;1(4):326-34.

Costa JV, Duarte JS. Tecido adiposo e adipocinas. *Acta Med Port.* 2006; 19: 251-6.

Di Ció AV, Klein L. Accion de las inyecciones subcutaneas de carbogeno sobre la tension arterial. *Prensa Med Argent.* 1950; 37(30):1707-9.

Di Ció AV. Sobre 2400 casos de claudicacion intermitente y gangrenas de las extremidades. *Prensa Med Argent.* 1956; 43(1):1-23.

Diji A, Greenfield AD. The local effect of carbon dioxide on human blood vessels. *Am Heart J.* 1960; 60:907-14.

Diji A. Local vasodilator action of carbon dioxide on blood vessels of the hand. *J Appl Physiol.* 1959; 14(3):414-6.

Fong SS, Hung LK, Cheng JC. The cutometer and ultrasonography in assessment of postburn hypertrophic scar: A preliminary study. *Burns.* 1997;(23):12-8.

Garcia MP, Chaves SB, Azevedo RB. Tecido adiposo. In: Curi R, Pompeia C, Miyasaka CK, Procópio J. *Entendendo a gordura - Os ácidos graxos*. São Paulo: Manole, 2002.

Gensch H. Die behandlung mit CO₂-Gas in der ambulanten ärztlichen praxis. In: *Bad elster FBK*, ed. Inf. reihe Kurortther 3 (Helf 2) 1989:77-80.

Großhans A, Gensch H. CO₂-Ginjection - Indikation und ergebnisse. *Z Arztl Fortbild (Jena)*. 1987; 81(12):613-4.

Großhans A. Erst erfahrungen über CO₂-Gas-insufflationen. *Z ärztl forbild*. 1984; 78:533-5.

Guyton AC, Jones CE, Coleman TG. Hormonal cardiac output and its variation. In: Guyton AC. *Cardiac output and its regulation*. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders, 1973. p. 3-29.

Heinicke HJ. Einführende mitteilung über die therapeutische subkutane quellgasinsufflation mit kohlen-dioxid. *Z Physiother*. 1985; 37:171-6.

Ito T, Moore JI, Koss MC. Topical application of CO₂ increases skin blood flow. *J Invest Dermatol*. 1989; 93(2):259-62.

Jonderko GZ, Nowicki L, Galaszek E. Subkutane CO₂ gasinsufflation bei der arterieller ver-schlusskrankheit. *Z Phis Med Baln med Klim (Sonder-helf 1)*. 1990:19-88.

Kede MPV, Sabatovich O. *Dermatologia estética*. São Paulo: Atheneu, 2004.

Lang EV, Gossler AA, Fick A. Carbon dioxide angiography effect of injection parameters on bolus configuration. *J Vas Inter Radiol*. 1999, 10:41-49.

Lantz PE, Smith JD. Fatal carbon dioxide embolism complicating attempted laparoscopic cholecystectomy - Case report and literature review. *J Forensic Sci*. 1994; 39(6):1468-80.

Mauad Jr, RJ. *Efeito do buflomedil e da pentoxifilina, isolados ou em associação, na viabilidade de retalhos cutâneos dorsais de ratos submetidos previamente a administração de nicotina: estudo da viabilidade dos retalhos através do processamento digital das imagens obtidas* [tese]. São Paulo, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2003.

Moskop Jr RJ, Lubarsky DA. Carbon dioxide embolism during laparoscopic cholecystectomy. *South Med J*. 1994; (87):414-5.

Rosner B. *Fundamentals of biostatistics*. 4th ed. Belmont: Duxbury, 1995.

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

Steuber H. Ergebnisse der CO₂ gasinsufflationstherapie bei patienten mit kopfschmerzen und aderen beschwerden. *Z Physiother*, 1990; 2:125-31.

Taubert K. Effektivität der kohlendioxid gasinsufflation bei migräne. *Z Arztl Fortbild (Jena)*. 1989; 83(15):785-6.

Taubert K. Kohlendioxidinsufflation bei kopfschmerz und migräne. *Z Arztl Fortbild (Jena)*. 1991; 85(1-2):23-30.

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

Tavares-Ferreira JC. Carboxiterapia na cicatrização de feridas crônicas no HGeF. *Rev Med HGF*. 2007; 8(2):14-5.

Tesar J. Vorkommen und zusammensetzung der für therapeutische zwecke, genutzten natürlichen quellgase in der CSSR. In *FBK bad eister*. ed reihe Kurortther 3 (heft 2). 1989:86-93.

Vik O, Tesar J. Beitrag über die chemische auswirkung subkutaner insufflations von Quellengas. *Balneol Borhem*. 1988; 17:11-7.

Volkmer E, Strobe I. Zur langzeitwirkung der CO₂ quellgasinsufflation bei reflektorischen cephalgieneine fullstudie. *Zärztl Fortbild*. 1990; 84:219-20.

Volkmer E. Schmerzdämpfende Wirkung der subkutanem CO₂-insufflationstherapie. *Schmerzther Kolloquium*. 1991; 7:8-9.

Volkmer E. Das natürliche Heilmittel CO₂ als insufflationstherapie. *Ärztezeitschr Naturheilverf.* 1992; 33:406-10.

Wajchenberg BL, Giannella-Neto D, Silva MER, Santos DA, Depot RF. Specific hormonal characteristics of subcutaneous and visceral adipose tissue and their relation to the metabolic syndrome. *Horm Metab Res.* 2002; 34:616-21.

Wilcox CD, Dove SB, McDavid D, Greer DB. UTHSCSA Image Tool. Disponível em: <<http://http://ddsdx.uthscsa.edu/dig/itdesc.html>>. Acesso em 7 nov 2008.

Wolf Jr JS, Carrier S, Stoller ML. Gas embolism: helium is more lethal than carbon dioxide. *J Laparoendosc Surg.* 1994; 4(3):173-7.

Zwaan M, Kloess W, Kagel C, Kummer-Kloess D, Matthies-Zwaan S, Schütz RM, Weiss HD. Carbon dioxide as an alternative contrast medium in peripheral angiography. *Rofo.* 1996; 164(5):445-8.