

Avaliação citométrica dos adipócitos localizados no tecido subcutâneo da parede anterior do abdome após infiltração percutânea de CO₂

Cytometric evaluation of abdominal subcutaneous adipocytes after percutaneous CO₂ infiltration

CÉLIA SAMPAIO COSTA¹; JOSÉ PINHATA OTOCH²; MARÍLIA CERQUEIRA LEITE SEELAENDER³; RODRIGO XAVIER DAS NEVES⁴; CARLOS AUGUSTO REAL MARTINEZ, TCBC-SP⁵; NELSON FONTANA MARGARIDO, TCBC-SP⁶

R E S U M O

Objetivo: Avaliar os efeitos da infiltração de dióxido de carbono em adipócitos presentes na parede abdominal. **Métodos:** Quinze voluntárias 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 infundido fixo de 250 mL/100cm² de superfície tratada. Os pontos de infiltração foram demarcados respeitando-se o limite eqüidistante 2cm entre eles. Em cada ponto se injetou 10mL, por sessão, com fluxo de 80mL/min. Foram colhidos fragmentos de tecido celular subcutâneo da parede abdominal anterior antes e após o tratamento. O número e as alterações histomorfológicas dos adipócitos (diâmetro médio, perímetro, comprimento, largura e número de adipócitos por campos de observação) foram mensurados por citometria computadorizada. Os resultados foram analisados com o teste t de Student pareado, adotando-se nível de significância de 5% (p<0,05). **Resultados:** Encontrou-se redução significativa no número de adipócitos da parede abdominal e na área, diâmetro, perímetro, comprimento e largura após o uso da hipercapnia (p=0,0001). **Conclusão:** A infiltração percutânea de CO₂ reduz a população e modifica a morfologia dos adipócitos presentes na parede abdominal anterior.

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

INTRODUÇÃO

No início da década de trinta, observações na França constataram que um simples banho com águas saturadas em dióxido de carbono (CO₂), melhorava a sintomatologia em portadores de doenças inflamatórias e isquêmicas, provavelmente por aumentar a circulação local¹. Posteriormente, verificou-se que a infiltração percutânea de CO₂ no tecido celular subcutâneo, através de agulhas, não só melhorava a circulação sanguínea nos tecidos isquêmicos, como aumentava a concentração local de oxigênio^{2,3}. Os efeitos terapêuticos da infiltração subcutânea do CO₂ foram atribuídos à vasodilatação local, que provocava queda da resistência vascular periférica, propiciando melhora da irrigação sanguínea. Essa vasodilatação, arterial e venosa, que propiciava o aumento do fluxo

sangüíneo local foi comprovada por estudos que mensuraram a perfusão sanguínea tecidual por fluxometria^{4,5}. Outro efeito da infiltração de CO₂ no tecido subcutâneo é o aumento da temperatura local o que determina um efeito lipolítico, que não é encontrado quando se utiliza outras misturas gasosas⁶. Ainda baseado em observações clínicas, já em pleno Século XXI, demonstrou-se que a infiltração de CO₂ no tecido celular subcutâneo, era capaz de reduzir depósitos de gordura localizados⁷. Todavia, apesar desses achados sugerirem que a redução nos depósitos de gordura ocorria por modificações no número e na forma dos adipócitos presentes no local, não se realizou qualquer estudo histológico que pudesse confirmar essas suspeitas.

O acúmulo localizado de gordura na região anterior do abdome é causa de constante preocupação clíni-

Trabalho realizado no Laboratório de Gorduras do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo e Hospital Universitário da Universidade de São Paulo – São Paulo – SP- BR.

1. Doutora pelo Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo –SP-BR; 2. Professor Associado do Departamento de Cirurgia Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - São Paulo – SP-BR; 3. Professora Associada do Departamento de Biologia Celular do Instituto de Biociências Biológicas da Universidade de São Paulo –SP-BR; 4. Estagiário do Laboratório de Gorduras do Instituto de Biociências Biológicas da Universidade de São Paulo – SP-BR; 5. Professor Adjunto do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco, Bragança Paulista – SP-BR; 6. Professor Titular da Disciplina de Topografia Estrutural Humana do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo- SP-BR.

ca e estética. Com o advento da lipoaspiração da parede abdominal a formação de pequenos depósitos subcutâneos de gordura durante o seguimento pós-operatório tornou-se uma das principais causas de insatisfação com a técnica⁸. Embora, as bases patofisiológicas dessa complicação, ainda não se encontrem totalmente esclarecidas, diferentes métodos vêm sendo propostos com objetivo de encontrar-se a melhor estratégia terapêutica para sua correção¹. Assim, a aplicação de agentes químicos ou físicos, vem sendo empregada de forma indiscriminada, todavia os resultados obtidos ainda são controversos^{9,10}. Insatisfeitos com os resultados alcançados, muitos doentes recorrem a procedimentos alternativos, a maioria das vezes realizados por indivíduos não habilitados, podendo além de piorar o resultado estético levar ao aparecimento de complicações graves e algumas vezes de evolução fatal¹¹.

Em 2004, demonstrou-se, pela primeira vez, que a infiltração de CO₂ no tecido celular subcutâneo, como medida alternativa a ser associada a procedimentos de lipoaspiração, era eficaz no tratamento dos acúmulos localizados de gordura ou irregularidades cutâneas decorrentes do procedimento cirúrgico¹. Foi possível demonstrar evidências histológicas dos efeitos benéficos desta opção terapêutica na redução da espessura da camada subcutânea abdominal, sugerindo que os efeitos do método pudessem estar relacionados ao aumento da circulação local, bem como da própria ação direta do CO₂ sobre adipócitos rompendo-lhes a membrana citoplasmática. Demonstrou-se melhora da elasticidade cutânea com redução do acúmulo de gordura quando a infiltração percutânea de CO₂ era realizada após lipoaspiração^{3,12,13}. A partir de então o método vem sendo utilizado com frequência cada vez maior para tratamento de diferentes formas de lipodistrofia, assim com na medicina estética¹⁴⁻¹⁶.

Apesar de utilizada, há mais de uma década, poucos estudos avaliaram as alterações histológicas nas células adiposas localizadas na parede abdominal anterior após a infiltração percutânea de CO₂¹³. Na literatura existe absoluta carência de estudos cientificamente conduzidos, avaliando os diferentes efeitos do método, principalmente no que se refere às alterações histológicas e citométricas dos adipócitos da tela subcutânea¹⁷.

O objetivo do presente estudo foi avaliar se a infiltração percutânea de CO₂ medicinal em áreas de gordura localizada na parede anterior do abdome relaciona-se com modificações na citométricas e no número de adipócitos analisados.

MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (nº HU/USP 857/08) sendo iniciado após aprovação pela Comissão Nacional de Estudos e Pesquisas (CONEP).

Foram avaliadas, prospectivamente, 15 mulheres, provenientes do Hospital Universitário da USP, com Índice de Massa Corpórea (IMC) variando entre 20 e 25 (saudável) no período compreendido entre janeiro de 2007 e janeiro de 2009, que se enquadravam dentro dos critérios de inclusão (sexo feminino, IMC entre 20 e 25, idade entre 24 e 50 anos, com área de acúmulo de gordura localizado na parede anterior do abdome, sem sinais de lipodistrofia). Foram excluídas as gestantes, lactantes, menopausadas, as que apresentavam enfermidades metabólicas ou auto-imunes, as que realizavam terapia de reposição hormonal, submetidas previamente à cirurgia abdominal (inclusive lipoaspiração) ou bariátrica, as portadoras de lesões dermatológicas na pele do abdome e as que apresentavam variação ponderal maior que dois quilos durante o período de duração do tratamento (três semanas). Todas as voluntárias após esclarecimento de todas as etapas do procedimento assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido concordando em participar do estudo assim como autorizando a realização da incisão abdominal necessária para coleta do material.

Padronização do método

Medidas antropométricas

Após serem selecionadas, todas as voluntárias foram submetidas às seguintes medidas antropométricas: medida do peso corpóreo (kg), altura (m) e o IMC (IMC = peso / altura²). Realizou-se a delimitação e mapeamento do perímetro da área com acúmulo de gordura na parede anterior do abdome (Figuras 1A e 1B). As medidas das circunferências abdominais foram sempre avaliadas segundo plano paralelo ao solo, com as voluntárias em posição ortostática. Foram aferidas duas circunferências, a primeira passando pelo umbigo e a segunda pelo ponto mais alto das cristas ilíacas ântero-superior direita e esquerda (Figura 2). Após sete dias da última sessão de infiltração de CO₂, foram realizadas novamente as mesmas medidas antropométricas.

Documentação fotográfica

A documentação fotográfica da região abdominal foi sempre realizada com a mesma distância focal nos planos (frontal, oblíqua direita, perfil direito, oblíqua esquerda, perfil esquerdo). De modo padronizado, as fotografias foram sempre realizadas com as voluntárias em posição ortostática sobre região previamente demarcada no solo, indicando a orientação os planos fotográficos estabelecidos. Sete dias após a última infiltração de CO₂ foram realizadas novas fotografias nos mesmos planos previamente estabelecidos.

Cálculo da superfície corpórea total e da área tratada com CO₂

O cálculo da superfície de área corpórea total (SAC), em metros quadrados, foi obtido segundo a fórmula SAC = K.p^{2/3}, (k = constante igual a 0,09; p = peso

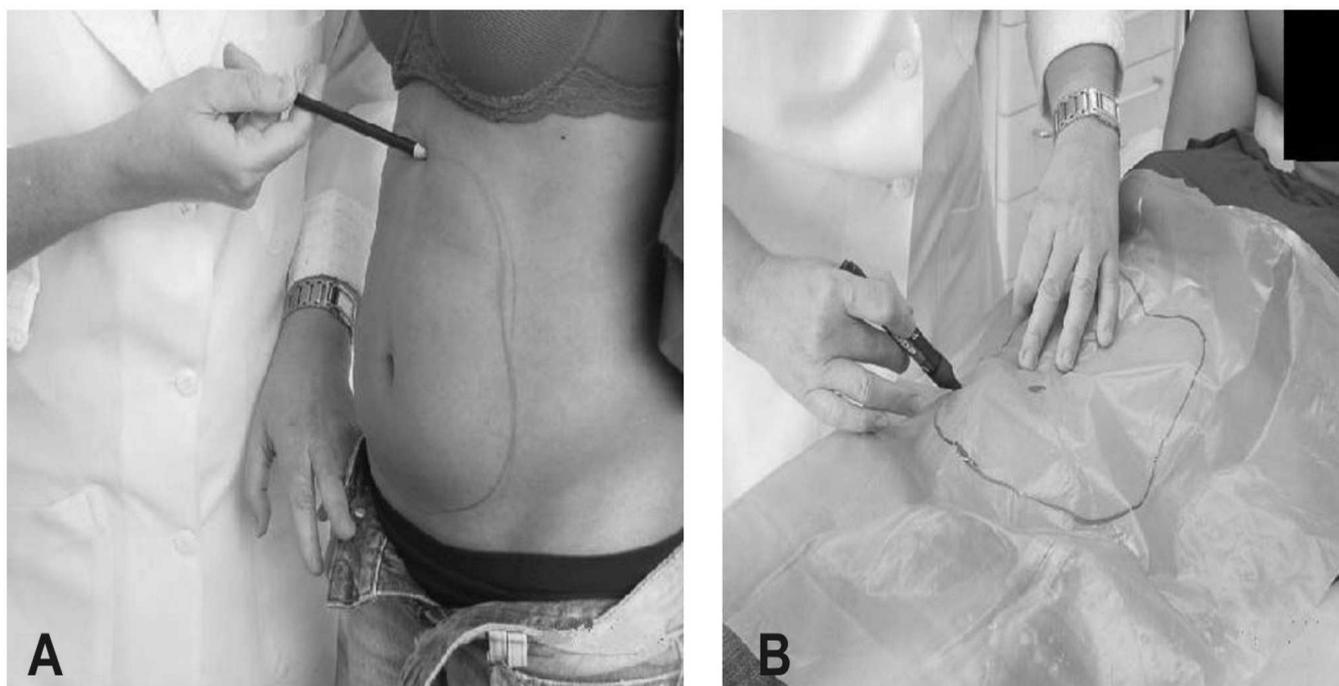


Figura 1 - (A) Demarcação do perímetro do acúmulo de gordura na parede anterior do abdome; (B) confecção do mapa individual da voluntária.

corpóreo em quilos)¹⁸. O cálculo da área de acúmulo localizado de gordura na parede anterior do abdome a ser tratada pela infiltração de CO₂, em números absolutos (cm²) e porcentagem (%) em relação à SAC, foi obtido, para cada voluntária através do método da correspondência fotográfica. Os mapas individuais das áreas de acúmulo de gordura na face anterior do abdome de cada voluntária foram documentados com o uso de câmera fotográfica digital (DSC-S50 - Sony Brasil Ltda. SP, Brasil), tendo ao lado um quadrado negro, com 10x10cm (100 cm²), cuja imagem servia de parâmetro quando da posterior digitalização das imagens. As imagens obtidas pela câmera digital foram transferidas para um microcomputador, e com ajuda de um programa de análise de imagens (Image Tool UTHSCSA – University of Texas Health Science Centes, SA, Texas, USA)¹⁹, as diferentes áreas a serem tratadas com CO₂ foram calculadas. A medida do quadrado negro serviu como base para o cálculo da área em centímetros quadrados e sua porcentagem. Cada cálculo de área foi obtido após mensuração da área a ser submetida à infiltração do CO₂, sempre pelo mesmo pesquisador (Figuras 3A e 3B).

Cálculo do volume de CO₂ infundido

O cálculo do volume de CO₂ a ser aplicado por sessão, na área de acúmulo localizado de gordura na parede anterior do abdome, foi estabelecido segundo metodologia anteriormente descrita que estimava em 250mL o volume de CO₂ necessário para se obter efeito terapêutico²⁰. O fluxo e o tempo de aplicação do CO₂ foi realizado por equipamento específico para esse fim, cali-



Figura 2 - 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 a ser considerada para o cálculo do volume de CO₂ a ser infiltrado no tecido subcutâneo.

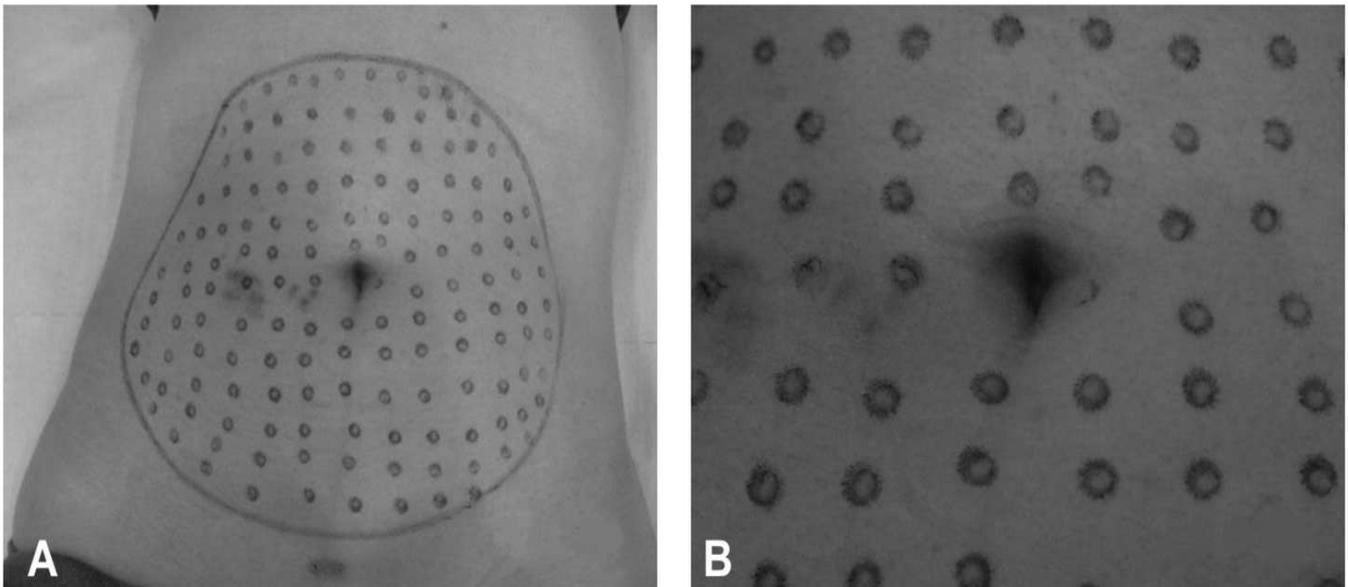


Figura 3 - (A) Demarcação dos pontos de infiltração do CO₂ no perímetro de acúmulo de gordura na parede abdominal anterior; (B) detalhe da mesma área.

brado para infiltrar sempre um fluxo de CO₂ de 80mL/min, o que conferia um tempo máximo de aplicação de oito segundos para cada ponto demarcado (Carbatek Advanced; Estek, São Paulo, Brasil).

Demarcação e punção dos locais de infiltração de CO₂

Com a voluntária em decúbito dorsal e utilizando o mapa individual, que demarcava o perímetro da área onde havia acúmulo localizado de gordura na face anterior do abdome, realizava-se nova marcação dessa área. Com uma caneta apropriada, foram assinalados, dentro desse perímetro, pontos equidistantes entre si, de 2cm, para estabelecer os locais onde seria realizada a punção para infiltração do CO₂ (Figuras 4A e 4B).

Para a punção e aplicação do CO₂ no subcutâneo, a paciente permanecia em decúbito dorsal horizontal. Após antisepsia da parede abdominal com solução alcoólica de clorexidina a punção era realizada utilizando agulha de calibre 30 G1/2, que penetrava na tela subcutânea, em cada ponto anteriormente demarcado, numa profundidade de 2cm. Em todas as áreas marcadas foram infiltrados 10mL de gás carbônico medicinal, completando-se assim, a quantidade destinada àquela área. As aplicações foram feitas duas vezes por semana, num total de seis sessões, com intervalos de dois a três dias entre as mesmas.

Biópsia pré e pós-tratamento

A biópsia do tecido celular subcutâneo antes e após a infiltração de CO₂ foi sempre realizada com a mesma técnica cirúrgica. O local para coleta do material pré-tratamento foi padronizado, para todas as voluntárias, antes da primeira sessão. O fragmento de pele e tecido celu-

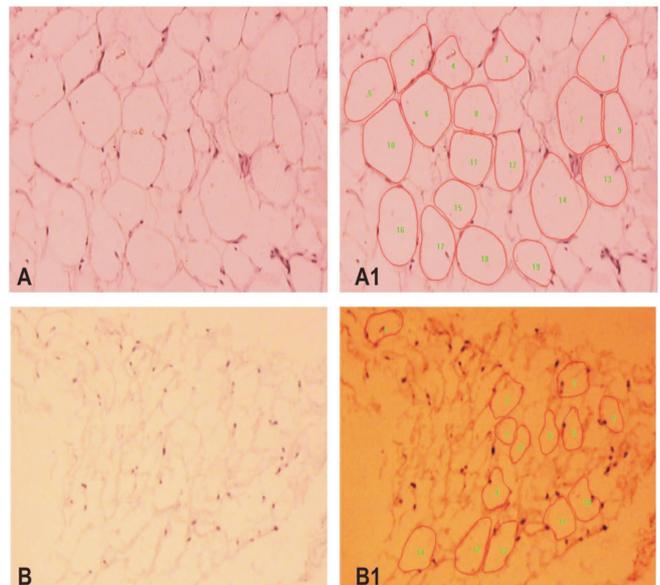


Figura 4 - Fotomicrofotografias de cortes histológicos dos adipócitos corados por HE com aumento de 100x. (A) momento pré-tratamento; (A1) demarcação do perímetro dos adipócitos; (B) momento pós-tratamento e (B1) demarcação do perímetro dos adipócitos.

lar subcutâneo foi sempre colhido tomando-se como padrão um ponto localizado 3cm à direita do umbigo, com a voluntária em decúbito dorsal horizontal. A biópsia pós-tratamento foi realizada num ponto situado 1cm abaixo em relação ao local onde foi realizada a biópsia pré-tratamento.

Para o procedimento realizava-se antisepsia do local com solução alcoólica de clorexidina e, a seguir realizava-se a infiltração anestésica lidocaína a 2% sem vasoconstrictor. A parede abdominal era coberta com cam-

po fenestrado estéril realizando-se incisão em fuso medindo 3x2 milímetros de extensão, interessando pele e tecido celular subcutâneo. Os fragmentos de tecido adiposo removidos, medindo 1cm de extensão, foram colocados em solução de paraldeído 4%, onde o espécime permanecia por período de 24 horas sendo, em seguida, transferido para outro frasco contendo álcool a 70%. Realizou-se a síntese do tecido subcutâneo com um ponto utilizando fio de poligalactina 5-0 e a pele com ponto intradérmico com fio de náilon 6-0. Terminada a intervenção a pele foi recoberta com fita adesiva estéril. Os pontos cirúrgicos foram retirados no oitavo dia de pós-operatório e, um novo curativo oclusivo foi realizado, com o objetivo de coaptar melhor as bordas da ferida cirúrgica e melhorar o aspecto da cicatriz.

Técnica histológica

Os espécimes cirúrgicos obtidos (pré e pós-tratamento) foram preparados em blocos de parafina que, posteriormente, foram submetidos a cortes histológicos, com 4m de espessura, para preparação das lâminas, sempre coradas pela técnica de hematoxilina-eosina²¹. Todas as lâminas foram analisadas em microscópio óptico, comum por patologista que desconhecia a origem do material, bem como os objetivos do estudo. Com o programa de análise de imagem assistida por computador Image-Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics; Bethesda, MD, USA) mensurou-se a área, diâmetro médio, perímetro, comprimento e largura dos adipócitos presentes nos espécimes (Figura 4). Em cada lâmina foram analisados seis campos aleatórios,

mensurando cada variável proposta^{22,23}. Contou-se o número de adipócitos presentes em cada campo, nos tecidos obtidos no pré e pós tratamento. Calculou-se o índice de elipticidade dos adipócitos, por meio da razão: C/L (C = comprimento e L = largura).

Todos os dados antropométricos individuais, assim como o valor das diferentes variáveis histológicas estudadas, foram anotados em planilhas específicas para posterior análise estatística. Utilizou-se o teste "t" de Student pareado para comparar os resultados obtidos nos dois momentos do estudo (pré e pós-tratamento) As variações dos resultados das medidas antropométricas foram avaliadas pelo teste de Kruskal-Wallis. Para os dois testes adotou-se grau de significância de 5% (p<0,05), marcando-se com um asterisco quando os valores apresentavam significância estatística. Os cálculos foram realizados utilizando-se o programa SPSS, versão 13.0.

RESULTADOS

A tabela 1 mostra os valores da avaliação antropométrica antes e após a infusão do CO₂. Não se encontrou variação significativa nas medidas antropométricas do peso (p=0,64), circunferência umbilical (p=0,31) e circunferência na crista ilíaca (p=0,32) antes e após as sessões.

A tabela 2 mostra a média, com o respectivo desvio padrão, dos valores obtidos para as variáveis

Tabela 1 – Peso, circunferência umbilical e circunferência da crista ilíaca pré e pós-tratamento com a infiltração percutânea de CO₂.

	Peso(kg)	Circunferência Umbilical (cm)	Circunferência crista ilíaca (cm)
	M ± DP	M ± DP	M ± DP
Pré	58,87 ± 5,62	83,17 ± 7,88	88,17 ± 6,82
Pós	58,20 ± 5,71	80,73 ± 8,06	86,00 ± 6,86
p	0,64	0,31	0,32

Teste de Kruskal-Wallis

Tabela 2 - Média dos valores mensurados por citometria computadorizada da área, diâmetro, perímetro, comprimento, largura e número de adipócitos antes e após a infiltração percutânea de CO₂.

	Média ± Desvio Padrão (μ)	
	Pré-tratamento	Pós-tratamento
Área	5349,00 ± 677,99	2992,79* ± 765,52
Diâmetro	78,22 ± 5,28	56,00* ± 5,53
Perímetro	268,82 ± 22,82	188,50* ± 34,07
Comprimento	96,81 ± 6,39	68,48* ± 11,77
Largura	71,50 ± 7,24	46,30* ± 11,85
Nº de adipócitos	449,00 ± 42,94	300,13* ± 18,16
Índice de elipticidade	1,35	1,48

Teste t pareado m = micrômetros; * = significante.

selecionadas mensuradas por citometria computadorizada (área, diâmetro, perímetro, comprimento, largura, e número de adipócitos) comparando os valores antes e após a infusão de CO₂. Houve redução significativa nos valores de todas as variáveis estudadas após emprego da infiltração percutânea de CO₂ ($p < 0,00001$).

DISCUSSÃO

Brandi *et al.*⁷ demonstraram, em 2001, pela primeira vez que a infiltração percutânea e sistematizada de CO₂ em regiões da parede abdominal com depósitos de gordura localizada poderia levar a ruptura dos adipócitos melhorando os resultados após à lipoaspiração. Os autores incentivaram o uso da técnica como complemento terapêutico coadjuvante para obterem-se melhores resultados cosméticos. A formação desses indesejáveis depósitos de gordura além de comprometerem a estética corporal, ainda não apresentavam uma alternativa terapêutica de consenso^{15,16}. Pelas propriedades lipolíticas a infiltração percutânea de CO₂ poderia ser uma alternativa eficaz para a dissolução desses indesejáveis depósitos de gordura que freqüentemente se formam após a lipoaspiração, melhorando os resultados cosméticos e a satisfação dos doentes^{1,3,7,12}.

Revisão sistemática da literatura confirmou a eficácia clínica dessa alternativa terapêutica¹². O baixo custo, o pequeno número de contra indicações formais (doentes sob anticoagulação, diástases hemorrágicas) e o baixo índice de complicações fatais fizeram com que a técnica ganhasse popularidade tornando-a cada vez mais utilizada²⁴⁻²⁶. Contudo, a infiltração percutânea de CO₂ vem sendo aplicada de forma empírica, não existindo estudos padronizando os diferentes aspectos técnicos envolvidos, tais como: volume necessário de CO₂ infiltrado, número e frequência das sessões, velocidade de aplicação do CO₂. São poucos os estudos que avaliaram os efeitos da técnica empregando métodos modernos para determinar os reais efeitos do CO₂ sobre os adipócitos da tela subcutânea¹³. A maioria das publicações, avaliou os efeitos do método, bem como as alterações histológicas encontradas no tecido celular subcutâneo, de forma empírica e subjetiva, não empregando qualquer método que possibilite uma avaliação mais precisa e objetiva. Com o advento de métodos de análise de imagem assistida por computador (morfometria computadorizada), tornou-se possível mensurar de forma fidedigna as alterações histológicas que ocorrem nas diferentes células e tecidos submetidos a diversas situações experimentais^{27,28}. A morfometria computadorizada vem sendo cada vez mais utilizada em estudos histopatológicos demonstrando-se metodologia válida por conferir maior precisão nas mensurações histológicas, facilidade de uso e baixo custo^{29,30}.

Com o objetivo de padronizar a casuística do presente estudo foram selecionadas apenas voluntárias,

que preenchessem os critérios de inclusão (idade média de 34 anos, índice de massa corpórea (IMC) entre 20 e 25). O IMC entre 20 e 25, foi escolhido, por caracterizar a condição denominada, por definição de saudável. Foram excluídas as mulheres menopausadas, grávidas, lactantes, que faziam reposição hormonal com o intuito de evitar que a ação hormonal pudesse interferir no metabolismo orgânico, modificando a massa de tecido adiposo. A faixa etária escolhida contempla mulheres adultas, em plena idade produtiva. A opção por estudar a gordura localizada na parede anterior do abdome, garantiu que sempre se pesquisasse o mesmo tipo de tecido adiposo, e em área de fácil delimitação, mensuração, documentação e controle. Portanto, o presente estudo avaliou apenas o acúmulo de gordura na parede anterior do abdome em mulheres saudáveis. Também foram excluídas do estudo voluntárias submetidas a qualquer tipo de procedimento cirúrgico abdominal (cirurgias plásticas ou bariátricas), assim como as voluntárias que acumulassem ganho ou perda ponderal maior do que dois quilos, com o objetivo de evitar que variáveis relacionadas à cicatrização ou a alterações no metabolismo de gorduras pudessem alterar os resultados.

Para assegurar uniformidade na avaliação antropométrica todas às medidas, tanto no pré quanto no pós-tratamento foram sempre aferidas no umbigo e nos pontos mais altos das cristas ântero-superiores, com as voluntárias sempre em posição ortostática. Essas circunferências acompanhavam planos paralelos ao solo. Do mesmo modo as amostras de tecidos antes e após o tratamento foram sempre retiradas no mesmo local da parede adominal, evitando compararem-se amostras oriundas de regiões distintas. Os resultados encontrados mostraram que não houve variação significativa nas mensurações do peso, circunferência umbilical e na altura das cristas ilíacas no início e no final do tratamento. É possível que com mais sessões pudessem ocorrer variações nessas medidas, assim com constatado por outros que adotaram períodos maiores de tratamento⁷.

A partir desses dados, foi possível correlacionar a área de acúmulo localizado de gordura na parede anterior do abdome, com outros parâmetros antropométricos, além do IMC, tendo como objetivo estabelecer correlações entre a extensão da superfície da área a ser tratada com o método e a superfície corpórea total com base em fórmula anteriormente proposta, que possibilita estimar essa área em metros quadrados. Com a demarcação do perímetro da área de acúmulo de gordura na parede anterior do abdome, foi possível elaborar mapas individuais dessa demarcação, e com a estratégia de se fotografar essa área com a mesma distância focal e utilizando um quadrado medindo 10x10cm justaposto, era possível calcular, com exatidão, a área de acúmulo de gordura pelo programa de análise de imagem computacional. A partir do conhecimento da área a ser tratada, foi possível calcular o volume de CO₂ a ser aplicado em cada sessão para cada voluntária.

ria. Essa mesma estratégia já tinha sido anteriormente utilizada³¹. De posse das áreas de superfície corpórea total, e da superfície a ser tratada com CO₂, foi calculada a porcentagem em relação à superfície corpórea total. Com essas informações, e com a proposta de se infundir sempre 250 mL de CO₂ para cada 100cm² de área, obteve-se uma referência precisa para o volume de CO₂ infundido por sessão em cada voluntária. A demarcação de pontos equidistantes, a cada 2cm, assegurou a infiltração de volumes iguais em cada ponto de punção. A aplicação do CO₂ realizada com o auxílio do equipamento descrito, que permite fixar a velocidade de aplicação em 80mL/min. Com a padronização do tempo de infiltração em oito segundos, foi possível assegurar que em cada ponto puncionado era aplicada a mesma quantidade de gás (10mL).

Durante cada sessão monitorizava-se a condição macroscópica da pele no ponto de infiltração. Em alguns pontos, constatava-se discreto eritema regional da pele, fugaz, assim como pequeno enfisema que persistiam por um período máximo de cinco minutos remetindo, totalmente, após esse período. As voluntárias relatavam que o desconforto doloroso durante a aplicação era suportável e de pequena intensidade. Nenhuma das voluntárias ao longo de todo estudo apresentou reações alérgicas ou infecções pós-aplicação. Esses mesmos achados também são descritos nos indivíduos que evoluíram com extensos enfisemas subcutâneos após procedimentos laparoscópicos no abdome^{12,26}. A única intercorrência digna de destaque foi a formação de pequenas equimoses esparsas em alguns pontos de punção.

No presente estudo o volume de CO₂ aplicado por sessão foi estabelecido com o maior rigor possível, baseando-se na extensão da superfície tratada. Procurou-se controlar rigorosamente o volume a ser aplicado, chegando-se a estimativa de 10mL para cada ponto de punção. Apesar já ter sido demonstrado efeitos terapêuticos os estudos anteriores estipulavam o volume diário de CO₂ aplicado de modo arbitrário, variando entre 20 e 800mL^{20,25,32}. A padronização adotada neste estudo permitiu concluir que para cada 100cm² de área a ser tratada o volume de 250mL, ou 10cm³, para cada ponto de punção apresentou eficácia terapêutica na redução do número e citometria dos adipócitos.

Outro aspecto que merece consideração é a periodicidade e a duração do tratamento para a obtenção de resultados efetivos. Estudos anteriores sugeriram aplicações de séries em dias alternados pelo prazo de duas a três semanas, podendo prolongar-se as aplicações de acordo com a evolução clínica^{5,15,25}. Portanto, a duração e o intervalo entre as sessões não obedeciam qualquer padrão, fazendo com que o número de sessões variasse de cinco a 20, sem qualquer justificativa científica para essa grande variação. Neste estudo, optou-se pela periodicidade de seis sessões com intervalos mínimos de dois dias, para se compor o tratamento ao longo dos sete dias da semana (21 dias ou três semanas). Esta padronização foi adotada em

todas as voluntárias, permitindo que a análise dos resultados não sofresse a interferência de infiltrações de CO₂ irregulares.

A análise histológica foi sempre realizada por profissional especializado e que adotara metodologia similar em estudos anteriores^{22,23}. Ao considerar-se que a amostra foi constituída por voluntárias sadias, os estudos histológicos pré tratamento, comprovaram dados de normalidade, o que conferia segurança para a afirmação de que se utilizou casuística composta por voluntárias sadias. Os resultados estatísticos semelhantes nos dados antropométricos, obtidos pela análise de variância nos momentos pré e pós-tratamento, demonstram que as regiões alvo das aferições foram as mesmas. O estudo histológico pós-tratamento demonstrou alterações citométricas nos adipócitos, de maneira uniforme com relação à área, diâmetro médio, perímetro, comprimento, largura e a razão comprimento/largura, que informa o índice de elipicidade. O programa de análise de imagem utilizado, permitindo a quantificação numérica e precisa de todas as variáveis selecionadas em dois momentos distintos, possibilitou o emprego de testes paramétricos para amostras pareadas que demonstraram redução significativa, de todas as variáveis analisadas após a aplicação percutânea do CO₂. Da mesma forma, a contagem dos adipócitos presentes em seis campos de visão mostrou uma redução de um terço (33,18%). Portanto, os resultados obtidos sugerem que a infiltração de CO₂ no volume, fluxo, tempo, número de sessões e intervalos propostos, foi capaz de reduzir o número e diminuir os valores das variáveis citométricas dos adipócitos localizados na parede anterior do abdome de mulheres saudáveis. É prudente imaginar que os efeitos observados possam ter duração finita, ou seja, serem temporários.

O tecido gorduroso é fundamentalmente um depósito de gordura, apresentando características diferentes conforme sua localização no organismo, todavia, na atualidade, existem evidências experimentais, indicando que os adipócitos produzem e secretam hormônios e citocinas, altamente ativas, como receptores específicos, e de importância fisiológica, atuando como verdadeiro órgão endócrino. No futuro, pesquisas científicas bem conduzidas, precisarão verificar, se a infusão de CO₂ medicinal, interfere nessas funções fisiológicas recentemente atribuídas ao tecido gorduroso. Trata-se, portanto, de um campo aberto, com perspectivas amplas e promissoras para esclarecer o papel da infiltração percutânea de CO₂ não apenas com fins estéticos para redução dos depósitos de gordura, mas a importância da técnica nos aspectos funcionais de todo o organismo.

Nas condições do presente estudo, foi possível concluir que a infusão padronizada de CO₂ no tecido subcutâneo da parede anterior do abdome de mulheres saudáveis reduz, significativamente, o número e tamanho dos adipócitos presentes no local.

A B S T R A C T

Objective: To evaluate the effects of carbon dioxide infusion to abdominal wall adipocytes. **Methods:** Fifteen volunteers were subjected to sessions of CO₂ infusion for three consecutive weeks (two sessions per week with intervals of two to three days between each). The volume of carbon dioxide infused per session, at points previously marked, was always calculated on the basis of surface area to be treated, with a fixed infused volume of 250 ml/100cm² of treated surface. The infiltration points were marked respecting the limit of 2cm equidistant between them. At each point 10 ml was injected per session, with a flow of 80ml/min. Fragments were collected from subcutaneous tissue of the anterior abdominal wall before and after treatment. The number and histomorphological changes of adipocytes (mean diameter, perimeter, length, width and number of adipocytes per field of observation) were measured by computerized cytometry. The results were analyzed with paired Student t test, adopting a significance level of 5% ($p < 0.05$). **Results:** There was a significant reduction in the number of adipocytes in the abdominal wall, as well as the area, diameter, perimeter, length and width of the adipocytes, after the infusion of CO₂ ($p = 0.0001$). **Conclusion:** The percutaneous infiltration of CO₂ reduces the population of adipocytes of the anterior abdominal wall and modifies their morphology.

Key words: Adipocytes. Subcutaneous tissue. Image processing. Computer-Assisted; Carbon dioxide/therapeutic use.

REFERÊNCIAS

- 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.
- Di Cío AV, Klein L. Action of subcutaneous injection of carbon on arterial tension. *Prensa Med Argent.* 1950;37(30):1707-9.
- Ito T, Moore JI, Koss MC. Topical application of CO₂ increases skin blood flow. *J Invest Dermatol.* 1989; 93(2):259-62.
- Diji A. Local vasodilatador action of carbon dioxide on blood vessels of the hand. *J Appl Physiol.* 1959;14(3):414-6.
- Volkmer E. Subcutaneous CO₂ insufflation therapy. *Schmerz* 1992;6(2):154-5.
- Diji A, Greenfield AD. The local effect of carbon dioxide on human blood vessels. *Am Heart J.* 1960;60:907-14.
- 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.
- Rosenbaum M, Prieto V, Hellmer J, Boschmann M, Krueger J, Leibel RL, Ship AG. An exploratory investigation of the morphology and biochemistry of cellulite. *Plast Reconstr Surg.* 1998;101(7):1934-9.
- Sun Y, Wu SF, Yan S, Shi HY, Chen D, Chen Y. Laser lipolysis used to treat localized adiposis: a preliminary report on experience with Asian patients. *Aesthetic Plast Surg.* 2009;33(5):701-5.
- Davis MD, Wright TI, Shehan JM. A complication of mesotherapy: noninfectious granulomatous panniculitis. *Arch Dermatol.* 2008;144(6):808-9.
- Lehnhardt M, Homann HH, Daigeler A, Hauser J, Palka P, Steinau HU. Major and lethal complications of liposuction: a review of 72 cases in Germany between 1998 and 2002. *Plast Reconstr Surg.* 2008;121(6):396e-403e.
- 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.
- 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.
- Campos V, Bloch L, Cordeiro T. Carboxytherapy for gynoid lipodystrophy treatment: the Brazilian experience. *J Am Acad Dermatol.* 2007;56(2-Suppl.2):AB196.
- Koutná N. Carboxytherapy: a new non-invasive method in aesthetic medicine. *Cas Lek Cesk.* 2006;145(11):841-3.
- Lee GSK. Carbon dioxide therapy in the treatment of cellulite: an audit of clinical practice. *Aesthetic Plast Surg.* 2010;34(2):239-43.
- Tavares-Ferreira JC. Carboxiterapia na cicatrização de feridas crônicas no HGF. *Rev Med HGF.* 2007;8(2):14-5.
- 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.
- Wilcox CD, Dove SB, McDavid D, Greer DB. UTHSCSA Image Tool. Disponível em: <http://ddsdx.uthscsa.edu/dig/itdesc.html>. Acesso em 7 nov 2008.
- Di Cío AV. 2400 cases of intermittent claudication and gangrene of the extremities treated by subcutaneous injection of oxygen-carbon dioxide mixture. *Prensa Med Argent.* 1956;43(1):1-23.
- Gamble M. The hematoxylin and eosin. In: Bancroft JD, Gamble M, editors. *Theory and practice of histological techniques.* New York: Churchill Livingstone. 2008; 2008. p.121-35.
- 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 tumour-bearing mice. *Brit J Cancer.* 2006;95(8):1028-37.
- Bing C, Trayhurn P. Regulation of adipose tissue metabolism in cancer cachexia. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2008;11(3):201-7.
- Heinicke HJ. Einführende mitteilung über die therapeutische subkutane Quellgasinsufflation mit kohlendioxid. *Phys Rehab Kur Med* 1985;37(3):171-6.
- Taubert K. Carbon dioxide insufflation in headache and migraine. *Z Arztl Fortbild (jena).* 1991;85(1-2):23-30.
- Wolf JS Jr, Carrier S, Stoller ML. Gas embolism: helium is more lethal than carbon dioxide. *J Laparoendosc Surg.* 1994;4(3):173-7.
- Martinez CAR, Waisberg J, Palma RT, Silva FZ, Cimerman G, Goffi FS. Morphometric study of gastric mucosa in dogs submitted to proximal gastric vagotomy, splenectomy or proximal gastric vagotomy associated with splenectomy. *Acta Cir Bras [serial on the internet].* 2002;17(5): 289-98. Disponível em <http://www.scielo.br/acb>.
- Sousa MV, Priolli DG, Portes AV, Cardinali IA, Pereira JA, Martinez CAR. Evaluation by computerized morphometry of histopathological alterations of the colon wall in segments with and without intestinal transit in rats. *Acta Cir Bras [serial on the internet].* 2008 23(5):417-24. Disponível em <http://www.scielo.br/acb>.
- Martinez CAR, Nonose R, Spadari APP, Máximo FR, Priolli DG, Pereira JA, Margarido NF. Quantification by computerized morphometry of tissue levels of sulfomucins and sialomucins in diversion colitis in rats. *Acta Cir Bras [serial on the internet].* 2010;25(3):231-40. Disponível em <http://www.scielo.br/acb>.
- Nonose R, Spadari APP, Priolli DG, Máximo FR, Pereira JA, Martinez CAR. Tissue quantification of neutral and acid mucins in the mucosa of the colon with and without fecal stream in rats. *Acta Cir Bras [serial on the internet].* 2009;24(4):267-75. Disponível em <http://www.scielo.br/acb>.
- Mauad RJ Jr, Shimizu MH, Mauad T, de Tolosa EM. Buflomedil and pentoxifylline in the viability of dorsal cutaneous flaps of rats treated with nicotine. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2006;59(4):387-92.

32. Joderko GZ, Nowicki L, Galaszek E. Subkutane CO₂ gasinsufflation bei der arterieller ver-schlusskrankheit. Z Phis Med Balm med Klin (Sonder-helf 1). 1990:19-88.

Recebido em 10/01/2010

Aceito para publicação em 12/03/2010

Conflito de interesse: nenhum

Fonte de financiamento: nenhuma

Como citar este artigo:

Costa CS, Otoch JP, Seelaender MCL, Neves RX, Martinez CAR, Margarido NF. Avaliação citométrica dos adipócitos localizados no tecido subcutâneo da parede anterior do abdome após infiltração percutânea de CO₂. Rev Col Bras Cir. [periódico na Internet] 2011; 38(1). Disponível em URL: <http://www.scielo.br/rcbc>

Endereço para correspondência:

Carlos Augusto Real Martinez

E-mail: caomartinez@uol.com.br