RÉGIA CELLI RIBEIRO PATRIOTA

**Estudo do laser Erbium Glass fracionado não ablativo no
tratamento do fotoenvelhecimento cutâneo : avaliação
clínica, histopatológica, microscopia eletrônica e
imuno-histoquímica**

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

Programa de Dermatologia

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Cucé

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 1 de novembro de 2011.
A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

**São Paulo
2013**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Patriota, Régia Celli Ribeiro

Estudo do laser Erbium Glass fracionado não ablativo no tratamento do
fotoenvelhecimento cutâneo : avaliação clínica, histopatológica, microscopia eletrônica
e imuno-histoquímica / Régia Celli Ribeiro Patriota. -- São Paulo, 2013.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Dermatologia.

Orientador: Luiz Carlos Cucé.

Descritores: 1.Lasers 2.Colágeno 3.Fibras elásticas 4.Imunoistoquímica
5.Envelhecimento da pele 6.Microscopia eletrônica de varredura 7.Interleucina-1
8.Fator de crescimento transformador beta 9.Molécula 1 de adesão intercelular
10.Caspase 3 11.Citometria de fluxo

USP/FM/DBD-250/13

DEDICATÓRIA

A **Deus**, a **Jesus** e a **Mãe Rainha de Schoenstatt**, razão da minha existência. A vida sem vocês é vazia e sem significado. Aos meus pais, **Romildo** e **Maria Eunice**, exemplo de dedicação e integridade de caráter e ao meu marido **Flávio**, companheiro e amigo em todos os momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Meu agradecimento e minha homenagem carinhosa ao **Prof. Dr. Luiz Carlos Cucé**, pessoa simples que com grande sabedoria, profissionalismo, diligência e generosidade orientou esta Tese. Por seu incentivo e por partilhar comigo o seu valioso conhecimento, minha eterna gratidão.

Agradeço ao **Prof. Dr. Cyro Festa Neto**, pelo apoio e confiança, e por me permitir fazer parte da sua equipe, o que muito me honra.

Com a **Profª Dra. Consuelo Junqueira Rodrigues**, há quanto tempo venho aprendendo... o quanto foi importante a sua participação, com sugestões, leituras e ensinamentos fundamentais para a qualidade deste estudo. Meu agradecimento pela sua essencial contribuição, sobretudo pela amizade e carinho.

Uma palavra de apreço e reconhecimento ao **Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria**, o quanto foi valiosa a sua leitura atenta e crítica da tese, as sugestões e as observações agudas sobre cada página, permitindo-me a correção e aprimoramento do texto; o seu apoio científico ímpar; a sua paciência e permanente disponibilidade em me ajudar em todos os momentos. A ele, minha eterna gratidão pelo estímulo e colaboração.

Ao **Prof. Dr. Raul Bolliger Neto**, que me ajudou na análise estatística dos dados. Meu muito obrigado.

Preciso homenagear o **Prof. Dr. Luiz Jorge Fagundes**, meu primeiro mestre na Dermatologia, pelo seu saber e por, generosamente, compartilhar comigo o seu vasto conhecimento. Jamais esquecerei o seu apoio, exemplo e amizade.

À **Profª Drª Mirian Nacagami Sotto** agradeço o incentivo, apoio e exemplo de profissionalismo.

Agradecimento especial a todos os assistentes do Departamento de Dermatologia do Hospital das Clínicas da FMUSP pelo carinho e incentivo, em especial aos **Profs. Drs. Walter Belda, Cláudia Santi, Ricardo Romiti, Eugênio Pimentel e Paulo Criado.**

Agradeço de forma coletiva aos funcionários do Departamento de Dermatologia do Hospital das Clínicas, as **médicas colaboradoras, complementandas, Gina Rocha, Alexandre Queiroz e Dr. Abdo Salomão** pela colaboração, apoio e atendimento prestativo sempre que precisei, bem como a **Valéria Lombardi, Márcia Arruda e Marinalva Aragão** funcionárias da biblioteca da FMUSP.

Aos meus amigos, **Raquel Ponchet, Walmar Roncalli, Helena Olegário, Ana Paula Meski, Luis Torezan, Nuno Osório e Paulo Barbosa**, pela amizade, incentivo e carinho.

Às minhas funcionárias **Vanda, Haydee e Silvana** pela amizade, carinho e cuidado, principalmente nos períodos mais difíceis.

Agradeço às minhas amigas, **Rosinha e Rosilda**, que me incentivaram ao longo desse tempo; ao meu amigo **Paulo Sérgio Zembruski**, pela incansável ajuda com os aspectos gráficos desta tese, bem como, ao **Josué Moreira de Souza** pela formatação final e à **Profª. Mércia Arruda** pela revisão gramatical.

A todos os **residentes e preceptores** do Departamento de Dermatologia do Hospital das Clínicas, agradeço o carinho e respeito. Sem vocês não teria incentivo para continuar estudando.

Um especial agradecimento **às pacientes**, pela confiança e sem as quais não teria sido possível a realização desta investigação.

Aos **Padres Ângelo, José Carlos e Adilton**, pelo amor, amizade, exemplo de vida e dedicação a Deus e ao próximo. Conviver com vocês é um grande privilégio. Meus agradecimentos pelas orações.

Aos meus pais, **Romildo** e **Maria Eunice** presente de Deus na minha vida. Com simplicidade, humildade, honestidade e muito trabalho me ensinaram a viver com dignidade e respeito.

Agradeço aos meus irmãos **Roseane, Rúbia, Rogério** e **Romildo** que sempre vibram com minhas conquistas, e aos meus sobrinhos **Thyago** e **Thyara** pelo carinho e torcida.

Agradeço a todas as pessoas que, de forma direta ou indireta, tiveram participação nesta conquista.

Finalmente, agradeço a presença amorosa, estímulo e cumplicidade do meu marido **Flávio de Sica**, a compreensão em razão dos inúmeros momentos de convívio que lhe foi tirado e o apoio, o qual foi determinante para a conclusão deste estudo. A ele meu eterno agradecimento, extensivo aos seus filhos, **Kika, Carol** e **Flavinho** e, também, à minha cunhada **Maria Lúcia**.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas

Lista de figuras

Lista de gráficos

Lista de tabelas

Resumo

Abstract

1	Introdução	1
2	Objetivo.....	8
3	Métodos.....	10
3.1	Casuística	11
3.2	Critérios de inclusão, exclusão e suspensão do paciente da pesquisa	11
3.3	Coleta do material fotográfico e biópsias	12
3.4	Tratamento	14
3.5	Critérios de avaliação clínica	15
3.6	Avaliação dos efeitos colaterais	16
3.7	Critério de avaliação histopatológica e imuno-histoquímica.....	16
3.7.1	Fibras colágenas e elásticas.....	17
3.7.2	Imuno-histoquímica	17
3.7.3	Avaliação histomorfométrica para fibras colágenas, elásticas e vasos ICAM +	19
3.7.4	Análise das fases do ciclo celular por citometria de fluxo.....	20
3.7.5	Análise do potencial elétrico da membrana mitocondrial por citometria de fluxo	21
3.7.6	Determinação da atividade da caspase-3 por citometria de fluxo....	22
3.7.7	Expressão de receptores por citometria de fluxo	22
3.7.8	Microscopia eletrônica de varredura em tecidos.....	23
3.8	Análise Estatística.....	24
4	Resultados.....	25
4.1	Avaliação Clínica.....	26
4.1.1	Avaliação de melhora clínica	26
4.1.2	Avaliação do grau de satisfação das pacientes.....	32
4.1.3	Avaliação dos efeitos colaterais	33
4.1.4	Avaliação do grau de dor segundo as pacientes.....	35

4.2	Análise histológica.....	36
4.3	Análise histomorfométrica das fibras colágenas.....	36
4.3.1	Análise Estatística comparativa da Fração de Área de Fibras Colágenas (%COL) na derme entre duas fases estudadas	42
4.4	Análise das fibras elásticas na derme.....	43
4.4.1	Análise Estatística comparativa da Fração de Área de Fibras Elásticas (%FE) na derme entre duas fases estudadas	47
4.5	Análise das reações imuno-histoquímicas para ICAM-1.....	48
4.5.1	Estatística Comparativa entre duas fases do estudo para fração de área de vasos na derme (ICAM-1+)	50
4.6	Análise das fases do ciclo celular por citometria de fluxo.....	51
4.7	Análise do potencial elétrico da membrana mitocondrial por citometria de fluxo	53
4.8	Determinação da atividade da caspase-3 fosforilada por citometria de fluxo	56
4.9	Receptores de expressão de membrana celular por citometria de fluxo.....	58
4.9.1	Receptor interleucina -1 (IL-1)	58
4.9.2	Receptor CD 34.....	60
4.9.3	Receptores de TGF- β	61
4.9.4	Determinação do índice proliferativo.....	63
4.10	Microscopia eletrônica de varredura	65
5	Discussão.....	68
6	Conclusões	80
7	Anexos	82
8	Referências	91

LISTA DE ABREVIATURAS

cm²	centímetros quadrados
cm	centímetro
HE	hematoxilina-eosina
J	joule
mJ	milijoule
LIP	luz intensa pulsada
mm²	milímetros quadrados
mm	milímetros
ms	milisegundos
nm	nanômetros
ICAM-1	molécula de adesão intercelular
IL-1	interleucina -1
CD34	marcador celular endotelial
TGF-β	fator transformador de crescimento beta
TNF-α	fator de necrose tumoral alfa
YAG	érbio ítrio alumínio granada
et al.	e outros
HC-FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
LIM	Laboratório de Investigação Médica
LASER	luz amplificada e estimulada por emissão da radiação
PI	iodeto de propídeo
PE	ficoeritrina
UVB	ultravioleta B

MEC	matriz extracelular
MTZ	zona microscópica de coagulação de tecido
W	watt
CF	fator de calibração
OBS	observação
°C	grau Celsius
MEV	microscopia eletrônica de varredura
MMP	metaloproteinase de matriz

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Fototermólise fracionada	5
Figura 2.	Técnica de aplicação	14
Figura 3.	Evolução do aspecto clínico após tratamento do fotoenvelhecimento da face com laser fracionado não ablativo, mostrando melhora da textura, clareamento, rugas e flacidez da pele.	27
Figura 4.	Evolução do aspecto clínico após tratamento do fotoenvelhecimento da face com laser fracionado não ablativo, mostrando melhora da textura, clareamento, rugas e flacidez da pele.	28
Figura 5.	Evolução do aspecto clínico após tratamento do fotoenvelhecimento da face com laser fracionado não ablativo, mostrando melhora da textura, clareamento, rugas e flacidez da pele.	29
Figura 6.	Evolução do aspecto clínico após tratamento do fotoenvelhecimento da face com laser fracionado não ablativo, mostrando melhora da textura, clareamento, rugas e flacidez da pele.	30
Figura 7.	A- Biópsia de pele pré-tratamento. Observa-se epiderme sem alterações histológicas e derme com espessura preservada contendo fibras colágenas densas. HEx40. B- Biópsia de pele após tratamento. Observa-se epiderme sem alterações histológicas. Derme mostra discreto aumento de colágeno. HEx40.....	37
Figura 8.	A- Pré-tratamento. Observa-se derme com fibras colágenas desorganizadas. B- Após tratamento observa-se melhor organização das fibras colágenas seguindo direção longitudinal paralela à epiderme. Picrosirius x100	38
Figura 9.	A- Pré-tratamento. Observa-se derme com fibras colágenas densas e entremeadas por tecido adiposo perianexial. B- Após tratamento observa-se derme espessa com fibras colágenas compactas e ausência de tecido adiposo perianexial. HEx40.....	38
Figura 10.	A- Pré-tratamento. Derme mostra fibras colágenas desorganizadas. B- Após tratamento a derme mostra rearranjo das fibras colágenas que apresentam uma distribuição mais homogênea. Picrosirius x100.....	39
Figura 11.	A- Pré-tratamento. A derme mostra colágeno denso. B- Após tratamento a derme mostra discreto aumento de colágeno. HEx40.....	39

- Figura 12.** A- Pré-tratamento. Derme mostra colágeno denso e tecido adiposo perianexial. B- Após tratamento a derme mostra discreto aumento de colágeno. HEx40 40
- Figura 13.** A- Pré-tratamento. Observa-se derme com colágeno denso e entremeada na profundidade por tecido adiposo. B- Após tratamento observa-se aumento da espessura da derme por colágeno denso. HEx40..... 40
- Figura 14.** A- Derme mostra fibras elásticas homogeneamente distribuídas, sendo algumas mais espessas e encurvadas e por vezes menores. Weigert x100. Em maior aumento observam-se fibras elásticas pequenas e rompidas em meio a fibras colágenas. Weigert x400. B- Após tratamento, observam-se fibras elásticas homogeneamente distribuídas. Em maior aumento observam-se fibras finas e alongadas em meio a fibras colágenas. Weigert x400 44
- Figura 15.** A- Pré-tratamento. Na derme observam-se fibras elásticas mais espessas por vezes amontoadas em uma área. Weigert x100. Em grande aumento observam-se fibras elásticas pequenas, fragmentadas e, por vezes, encurvadas. Weigert x400. B- Após tratamento observa-se distribuição mais homogênea das fibras elásticas na derme reticular. Weigert x100. Em grande aumento observam-se fibras elásticas mais finas, alongadas e que acompanham a direção das fibras colágenas. Weigert x400 45
- Figura 16.** A- Pré-tratamento. A derme mostra vasos capilares marcados pela reação de imuno-histoquímica para ICAM. B- Após tratamento observa-se discreto aumento da quantidade de vasos capilares marcados pela reação de imuno-histoquímica para ICAM x400..... 48
- Figura 17.** Fotomicrografias das amostras obtidas em MEV pré e após tratamento. Seta branca - sulco pré-tratamento e rugas; seta preta – corneócitos intactos e hidratados 66
- Figura 18.** Fotomicrografia das amostras da derme obtidas por MEV após a aplicação do laser. Destacam-se no colchete: preenchimento do sulco e organização das fibras da MEC; Seta amarela tracejada: estrutura do poro da derme superficial; Seta verde tracejada: abertura da glândula e presença de flora bacteriana; Seta verde: microvilus e orientação das fibras de sustentação 67

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1.	Avaliação clínica após 4 meses dos três observadores (AV1, AV2 e AV3)	31
Gráfico 2.	Grau de satisfação das pacientes.....	33
Gráfico 3.	Avaliação dos efeitos colaterais.....	34
Gráfico 4.	Avaliação do grau de dor	36
Gráfico 5.	Gráfico representando a análise da média da %COL na derme em duas fases diferentes do estudo	42
Gráfico 6.	Gráfico representando a análise da média da %FE na derme em duas fases diferentes do estudo	47
Gráfico 7.	Gráfico representando a análise da média do %ICAM na derme em duas fases diferentes do estudo	50
Gráfico 8.	Gráficos representando o histograma das fases do ciclo celular, obtido pela citometria de fluxo	51
Gráfico 9.	Gráficos representando a distribuição da quantidade de DNA/células nas diferentes fases do ciclo celular.....	52
Gráfico 10.	Gráficos do tipo “dot plot” e histograma do potencial elétrico das mitocôndrias.....	53
Gráfico 11.	Gráficos de barras das médias do percentual de mitocôndrias obtidas por citometria de fluxo	54
Gráfico 12.	Gráficos representando a % da distribuição das células que apresentam mitocôndrias ativas e hiperativas.....	55
Gráfico 13.	Gráficos do tipo “dot plot” obtidos por citometria de fluxo representando a atividade da Caspase-3	57
Gráfico 14.	Gráfico representando a média $\pm$ dp da porcentagem da expressão Caspase-3	57
Gráfico 15.	Gráfico do tipo “dot-plot” obtido por citometria de fluxo da população celular da IL-1r.....	59

Gráfico 16. Gráfico representando a média $\pm$ dp da porcentagem de expressão do receptor de IL-1	59
Gráfico 17. Gráfico do tipo “dot plot” obtido por citometria de fluxo, da população celular do CD34.....	60
Gráfico 18. Gráfico representando a média $\pm$ dp da porcentagem de expressão do marcador CD34.....	61
Gráfico 19. Gráfico do tipo “dot plot” obtido por citometria de fluxo da população celular do TGFR1	62
Gráfico 20. Gráfico representando a média $\pm$ dp da porcentagem de expressão do marcador TGFR1	62
Gráfico 21. Histogramas representativos obtidos pelo programa Wizard utilizado na determinação do índice proliferativo por citometria de fluxo	64
Gráfico 22. Gráfico representando a média $\pm$ dp do índice proliferativo	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Descrição das pacientes segundo a idade, fototipo, classificação de Glogau ⁽²⁷⁾ e avaliação clínica através da comparação de fotografias pelos três observadores (4 meses)	26
Tabela 2.	Resultado da avaliação clínica após 4 meses segundo os 3 observadores (15 casos)	31
Tabela 3.	Resultado da avaliação do grau de satisfação das pacientes	32
Tabela 4.	Efeitos colaterais decorrentes do tratamento.....	34
Tabela 5.	Avaliação de dor durante o tratamento	35
Tabela 6.	Valores individuais da fração de área de colágeno (%) na derme das biópsias de pele estudadas.....	41
Tabela 7.	Estatística Descritiva da fração de área de colágeno na derme.....	41
Tabela 8.	Valores individuais da fração de área de Fibras Elásticas na derme das biópsias de pele estudadas	46
Tabela 9.	Estatística Descritiva da fração de área de Fibras Elásticas na derme ...	46
Tabela 10.	Valores individuais da fração de área ocupada pelos vasos dérmicos ICAM+ nas biópsias de pele estudadas.....	49
Tabela 11.	Estatística Descritiva de %ICAM nos vasos da derme	49
Tabela 12.	Média $\pm$ dp das populações celulares distribuídas nas fases do ciclo celular.....	52
Tabela 13.	Média $\pm$ dp da distribuição da quantidade de mitocôndrias.....	54
Tabela 14.	Média $\pm$ dp das mitocôndrias ativas e inativas obtidas por citometria de fluxo.....	55

RESUMO

Patriota RCR. *Estudo do laser Erbium Glass fracionado não ablativo no tratamento do fotoenvelhecimento cutâneo: avaliação clínica, histopatológica, microscopia eletrônica e imuno-histoquímica* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina. Universidade de São Paulo; 2013. 99p.

Introdução: Os lasers fracionados não ablativos são efetivamente utilizados no rejuvenescimento da pele. As novas tecnologias a laser permitem uma remodelação dérmica seletiva, sem ablação da epiderme. **Objetivo:** Avaliar a eficácia do laser Erbium Glass (sellas evo®) fracionado não ablativo 1550nm no rejuvenescimento facial através do estudo da quantificação histomorfométrica de fibras colágenas e elásticas, a expressão da molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1) por imuno-histoquímica, a análise das fases do ciclo celular, o potencial elétrico da membrana mitocondrial, a expressão de interleucina-1 (IL-1), o marcador celular endotelial CD34, o receptor do fator transformador de crescimento beta (TGF- β), atividade da caspase-3 por citometria de fluxo e as alterações ultraestruturais na pele por microscopia eletrônica de varredura, 4 meses após o tratamento com laser. **Materiais e Métodos:** Quinze indivíduos (média de 56,4 anos, fototipo II-IV), com fotoenvelhecimento cutâneo na face fizeram 3 tratamentos com laser Erbium Glass fracionado não ablativo 1550nm usando uma fluência de 70 mJ e uma densidade de 100 cm². Foram avaliados biópsias na região pré-auricular em 15 pacientes no início e 4 semanas após o tratamento final. Os níveis de expressão dos receptores e a atividade do potencial elétrico mitocondrial foram analisados na suspensão de células da derme obtida a partir da digestão por collagenase. A avaliação clínica e fotográfica foi analisada quatro semanas após o final do tratamento. **Resultados:** Após 4 meses do início do tratamento foi observada melhora clínica moderada, com uma média de satisfação de 8,8, as fibras de colágeno aumentaram em 6,68%, as fibras elásticas mostraram uma diminuição de 12,85%, o ICAM-1 aumentou 4,47% significativamente na área dos vasos. Houve aumento significativo dos níveis de expressão do receptor de IL-1 e TGF- β após o tratamento com laser Erbium Glass. As respostas proliferativas e a ausência de apoptose dependente da caspase-3 foram observadas nas suspensões de células após o tratamento. **Conclusão:** Rejuvenescimento facial com laser Erbium Glass fracionado não ablativo 1550nm demonstrou melhora visível no fotoenvelhecimento, assim como, aumento significativo da expressão de IL-1 e receptores de TGF- β , que estão envolvidos na remodelação e indução da proliferação de componentes da matriz extracelular da pele. O grau de satisfação foi alto especialmente em relação à textura, rugas e discromias.

Descritores: 1.Laser 2.Colágeno 3.Fibras elásticas 4.Fotoenvelhecimento 5.IL-1 6.TGF- β 7.Caspase3 8.Citometria de fluxo 9.Microscopia eletrônica de varredura

ABSTRACT

Patriota RCR. *Study of Erbium Glass Laser Fractional non-ablative treatment of photoaging: Clinical evaluation, histopathology, electron microscopy and immunohistochemistry* [Thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina. Universidade de São Paulo; 2013. 99p.

Background: Non-ablative fractional lasers have been effectively used in skin rejuvenation. The new laser technologies allow selective dermal remodeling without ablation of the epidermal surface. **Objectives:** To evaluate the efficacy of the 1550 nm Erbium Glass Laser (Sellas Evo) for facial rejuvenation through study of the histomorphometric quantification of collagen and elastic fibers; the expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) by immunohistochemistry; and analysis of the cell cycle phases, the electrical potential of the mitochondrial membrane and the expression of interleukin 1 (IL-1), the endothelial cell marker CD34 and transforming growth factor beta (TGF- β) receptors, caspase-3 activity by flow cytometry and the ultrastructural changes in the skin by scanning electron microscopy 4 months after the laser treatment. **Materials and Methods:** Fifteen subjects (mean age 56,4 skin types II-IV) with photodamage on the face and wrinkles had 3 treatments with the 1550 nm Erbium Glass Laser using a fluence of 70 mJ and a density of 100 cm². Pre-auricular biopsies from 15 subjects were evaluated at baseline and 4 weeks after the final treatment. Receptor expression levels and the presence of potentially functional mitochondria were analyzed in a cell suspension obtained from collagenase digestion of the skin. Data from the photo assessments and the subjects' self-assessed improvements were analyzed 4 weeks after the final treatment. **Results:** Four months after the last treatment application, clinical improvement was observed, with an average satisfaction score of 8.8, corresponding to moderate improvement. After 4 months of treatment, collagen fibers had increased up to 6.68%, while the average proportion of collagen fibers in the dermis, the elastic fibers, showed a 12.85% decrease of ICAM-1 and a mean increase in vessel area of 4.47%. Significantly enhanced IL-1 and TGF- β receptor expression levels were identified after Erbium Glass Laser treatment. Proliferative responses and non-apoptosis-dependent caspase-3 activity were both observed in the cell suspensions after dermal treatment. **Conclusion:** Non-ablative rejuvenation with the 1550 nm Erbium Glass Laser was demonstrated, as well as highly improvement in the photodamage and the expression of IL-1 and TGF- β receptors, that are involved in remodeling and induced proliferation components in the extracellular matrix of skin fibers. The subjects were highly satisfied, especially regarding texture, rhytids and dyschromia.

Descriptors: 1.Laser 2.Collagen 3.Elastic fiber 4.Photoaging 5.IL-1 6.TGF- β 7.Caspase3 8.Flow citometry 9.Scanning electron microscopy

1 Introdução

O envelhecimento cutâneo pode ser dividido em envelhecimento cronológico e fotoenvelhecimento ^(1,2).

O envelhecimento cronológico ou intrínseco é determinado geneticamente e o envelhecimento extrínseco, também chamado fotoenvelhecimento, ocorre por exposição cumulativa à radiação ultravioleta ^(3,4).

Além do fotoenvelhecimento e do envelhecimento cronológico, existem mais três fatores que interagem no envelhecimento da face, são eles: ação da gravidade, linhas de expressão e rugas de dormir ⁽⁵⁾.

O envelhecimento se caracteriza por uma série de alterações clínicas e histológicas. Na clínica, apresenta-se por atrofia da pele em grau variável que é evidenciada pelo adelgaçamento difuso, ressecamento e pregueamento cutâneo. A pele torna-se ligeiramente amarelada com perda da elasticidade e da turgescência. Os pelos diminuem de volume, em número e se tornam esbranquiçados; enquanto as unhas ficam frágeis e sem brilho. Há diminuição progressiva da secreção sebácea e sudorípara, e também do conteúdo de água da derme, tornando a pele mais ressecada. Ocorre reabsorção óssea do terço inferior da face e queda da pele devido aos efeitos da gravidade. Movimentos musculares repetidos criam linhas de expressão principalmente na fronte, glabella, região periocular e perioral. Ocorre atrofia progressiva da gordura que resulta em concavidade da área temporal e bochechas ^(1,6).

As alterações clínico-morfológicas que caracterizam a pele fotoagredida são: aspereza, irregularidade da superfície, despigmentação mosqueada provocada por melanócitos superestimulados pelos raios ultravioleta, telangiectasias que surgem pelo alargamento de pequenos vasos e rugas finas ou ríides actínicas, que surgem

devido ao enfraquecimento dos tecidos de suporte e perda da elasticidade. De modo geral, os vasos cutâneos diminuem e isso se revela pela coloração amarelo-citrina que a pele envelhecida adquire. Os casos extremos de fotoenvelhecimento clinicamente apresentam aspecto geométrico romboidal na nuca descrito como *cútis rhomboidalis nuchae* ^(1,6,7,8).

Em relação aos fenômenos histológicos do envelhecimento, existem diferenças entre o intrínseco e o extrínseco. Basicamente, há alterações atróficas no envelhecimento intrínseco. Na epiderme, observa-se diminuição da espessura, os queratinócitos são achatados, há atrofia da derme e diminuição do tamanho dos fibroblastos. No envelhecimento extrínseco, a epiderme apresenta hiperqueratose, os melanócitos estão em maior número e observa-se o achatamento da junção dermoepidérmica. Na derme, há larga faixa de material eosinofílico, chamada de Zona Grenz, ocorre acúmulo de fibras elásticas, formando massas amorfas, é o material elastótico, os fibroblastos estão em número reduzido e as fibras colágenas são finas ⁽⁹⁾.

A pele tem papel importante no desenvolvimento e manutenção da defesa imunológica. A migração de leucócitos para os locais de inflamação é um aspecto importante tanto da imunidade inata, como daquela adquirida. Inicialmente, os leucócitos ligam-se ao endotélio vascular e, após atravessá-lo, migram em direção ao processo inflamatório. Esta ligação e a passagem através do endotélio vascular, depende da ligação dos leucócitos com as moléculas de adesão intercelular-1 (ICAM-1), ^(10,11). O ICAM-1 faz o reconhecimento do antígeno de células T e da interação célula endotelial leucócito elevando a resposta inflamatória ^(12,13,14,15). Esta molécula de adesão é também induzida por interleucina-1 (IL-1) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) ⁽¹⁵⁾.

O ICAM-1 é uma proteína de membrana glicosilada, membro da família das imunoglobulinas ⁽¹⁶⁾.

Os primeiros estudos mostram que o ICAM-1 não se expressa nos queratinócitos da pele normal ⁽¹⁷⁾, mas está presente em processos cutâneos imunoinflamatórios como líquen plano, psoríase e dermatite alérgica de contato, e sua expressão está relacionada à infiltração de linfócitos T na epiderme ⁽¹⁸⁾. Foi demonstrado que o ICAM-1 tem expressão também nas células de Langerhans ⁽¹⁹⁾. Após traumas na pele e exposição à radiação ultravioleta B (UVB) ocorre aumento da sua expressão. Um estudo evidenciou que uma hora após uma leve fricção da pele com uma borracha, por dois minutos, houve um aumento da expressão de ICAM-1, persistindo por quatro horas ⁽²⁰⁾.

Em 1983, Anderson e Parrish revolucionaram o uso do laser ao desenvolverem o conceito da fototermólise seletiva que consiste na obtenção de uma lesão térmica local e específica, de alvos teciduais microscópicos pigmentados, provocada por pulsos de radiação absorvidos seletivamente. Desta maneira, a luz só deposita energia onde esta é absorvida.

O laser é um dispositivo que produz radiação eletromagnética com características muito especiais: ela é monocromática (apresenta um único comprimento de onda), coerente, colimada e propaga-se como um feixe unidirecional.

Os lasers ablativos de CO₂ e Erbium-YAG são considerados os mais efetivos para o fotorrejuvenescimento, podendo tratar todas as alterações do fotoenvelhecimento, as vezes com apenas uma sessão, removendo lesões de pele benignas, pré-malignas e oferece benefícios profiláticos na prevenção de neoplasias não melanoma ^(21,22).

Os lasers não ablativos apresentam complicações reduzidas com eficácia limitada ⁽²³⁾. Melhora as lesões superficiais vasculares e pigmentadas pela melanina, necessitando de várias sessões para uma melhora evidente das rítes.

Com o avanço de novas tecnologias em lasers e as exigências dos pacientes por tratamentos minimamente invasivos, seguros e eficazes, criou-se uma nova teoria de tratamento da pele envelhecida: a fototermólise fracionada. Esta tecnologia

fracionada caracteriza por microscópicas zonas de coagulação de tecido (MTZ), que vão cicatrizando ao longo de algumas semanas enquanto a superfície da pele conserva uma aparência normal ⁽²⁴⁾. Esse conceito de emissão fracionada da luz para criar zonas de tratamentos microscópicas tem o intuito de contornar a agressividade dos lasers ablativos tradicionais, que provocam injúria na pele, aumentando o tempo de cicatrização cutânea e complicações após o laser ⁽²⁵⁾.

Antes de atingir a pele o laser passa por uma lente óptica especial que o divide em microrraios. Este procedimento produz colunas de lesões térmicas microscópicas que penetram na epiderme e derme, sem danificar o tecido circunvizinho (Figura 1). Vários parâmetros como energia, duração do pulso, densidade de microrraios, número de pulsos no mesmo local, dentre outros, podem ser manipulados para customizar o tratamento, produzindo colunas tridimensionais com formas e profundidades diferentes, de acordo com cada afecção a ser tratada. A maior vantagem do laser ser fracionado, é que a pele íntegra ao redor de cada coluna funciona como um reservatório de células potentes para a rápida cicatrização e regeneração da pele, culminando com a produção de colágeno e resultando em uma pele mais jovial, sem o desconforto de um longo período de recuperação após o tratamento ⁽²⁵⁾.

Figura 1. Fototermólise fracionada

http://en.sellaslaser.com/products/sellas_evo.htm

Analizando os possíveis mecanismos de ação do laser fracionado não ablativo, nos levou a estudar:

- as fases do ciclo celular que é um processo pelo qual uma célula somática duplica seu material genético e o reparte igualmente às suas células-filhas, normalmente é dividido em quatro fases (S-síntese de DNA, M- mitose, G1 e G2), estas células se distribuem no período de preparo, síntese e divisão celular por critérios bioquímicos e cinéticos;
- as mitocôndrias, organela responsável pelos eventos oxidoredutores, e produção do adenosina trifosfato (ATP), energia utilizada pelas células para as suas atividades;
- as expressões das citocinas pró-inflamatórias, interleucina-1 (IL-1), produzida pelos macrófagos, monócitos e fibroblastos;
- o fator transformador de crescimento beta (TGF- β), agente anti-inflamatório, atua na vasculogênese, angiogênese, integridade da parede vascular e acelera a cicatrização por estimular diretamente os fibroblastos;
- o marcador celular endotelial CD34, que é uma glicoproteína, transmembrana expressa em células progenitoras hematopoéticas, em células endotéliais, fibroblastos embrionários e em algumas células do tecido nervoso fetal e adulto;
- a atividade da caspase-3 fosforilada. As caspases são proteases que tem papel importante na apoptose ou morte celular programada;
- a microscopia eletrônica de varredura capaz de observar a superfície de um espécime sólido. Esta técnica proporciona uma imagem tridimensional do objeto que está sendo observado;

-
- o índice proliferativo permite estudar populações de células em proliferação, identificando a viabilidade celular de sucessivas gerações de células. Quando uma célula marcada com carboxifluoresceína (CFSE) divide-se, as suas descendentes apresentam-se marcadas com metade do fluorocromo.

2 Objetivo

O propósito do presente trabalho consiste na avaliação:

- clínica e quantificação histomorfométrica de fibras colágenas e elásticas da pele fotoenvelhecida submetida a tratamento com laser Erbium Glass fracionado não ablativo 1550nm, 3 sessões com intervalo mensal;
- da expressão da molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1) por imuno-histoquímica;
- da análise das fases do ciclo celular;
- do potencial elétrico da membrana mitocondrial;
- da expressão de interleucina-1 (IL-1);
- do receptor do fator transformador de crescimento beta (TGF- β);
- do marcador celular endotelial CD34;
- da atividade da caspase-3 por citometria de fluxo;
- das alterações ultraestruturais na pele por microscopia eletrônica de varredura (MEV) 4 meses após o início do tratamento com laser
- e do índice proliferativo

3 Métodos

3.1 Casuística

Foram selecionados para o estudo 15 indivíduos do sexo feminino, com idades que variam entre 48 e 63 anos (média de 56,4 anos) do Ambulatório de Inestética do Departamento de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP). As pacientes apresentavam fototipo II a IV ⁽²⁶⁾, (Anexo1), e fotoenvelhecimento cutâneo na face, grau III pela escala de Glogau ⁽²⁷⁾. Os procedimentos tiveram início após a explicação detalhada da pesquisa e a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, segundo a Resolução do Conselho Nacional de Saúde 196, de 10 de outubro de 1996, aprovado pela comissão de ética do HC-FMUSP sob nº 0300/11. (Anexos 2 e 3).

3.2 Critérios de inclusão, exclusão e suspensão do paciente da pesquisa

Foram considerados critérios de inclusão:

- a) Paciente do sexo feminino;
- b) Idade entre 48 e 63 anos;
- c) Fototipo de I a IV ⁽²⁶⁾;
- d) Presença de sinais de fotoenvelhecimento na face ⁽²⁷⁾;
- e) Consentimento assinado após ampla explicação;
- f) Paciente na menopausa.

Foram considerados critérios de exclusão:

- a) Todas as pacientes que haviam sido previamente submetidas a algum procedimento cosmético na região da face, incluindo tratamento com LIP ou Laser;
- b) Pele bronzeada e / ou com fototipos V e VI de Fitzpatrick ⁽²⁶⁾;
- c) Portadores de doenças agravadas pela luz;
- d) Pacientes em uso de drogas fotossensibilizantes;
- e) Pacientes com história de quelóide ou cicatriz hipertrófica;
- f) Paciente com impossibilidade de fazer fotoproteção durante todo o tratamento;
- g) Pacientes com doenças cutâneas em atividade na região da face;
- h) Pacientes com história de herpes facial;
- i) Recusa em assinar o termo de consentimento orientado.

A suspensão do paciente da pesquisa ocorreria a qualquer momento por desejo do paciente ou a critério do pesquisador diante de situações que demonstrassem prejuízo ao paciente.

3.3 Coleta do material fotográfico e biópsias

Após a inclusão do paciente, este foi submetido à entrevista (Anexo 4), a registro fotográfico e à biópsia da região facial.

Os indivíduos selecionados foram orientados a não usar medicações na face. As fotografias foram tiradas em três posições para cada paciente: frente, perfil direito

e esquerdo. A padronização das fotografias foi realizada previamente através do protocolo com as seguintes características técnicas:

1. Câmera fotográfica digital reflex Canon 5D Mark II 21 MB pixels de resolução.
2. Lente Canon Macro EF 100 mm, 1: 2.8 USM.
3. Velocidade de obturação em sincronismo de flash de 1/200.
4. Abertura do diafragma ajustado para f 18,0-0 EV.
5. Iluminação artificial obtida por Flash 580 EX2 Canon com iluminação frontal rebatida.
6. A distância entre o paciente e o plano da máquina fotográfica ficou em aproximadamente 140 cm.
7. O ISO utilizado na camera foi 800.
8. As imagens foram capturadas e armazenadas no formato Raw e convertido para JPEG 300 dpi RGB 8 bits, com tamanho físico de 10 x 15 cm.
9. Em cada sessão fotográfica foram realizadas três fotografias de cada paciente: frente, perfil direito e esquerdo.

O protocolo fotográfico foi realizado em duas sessões fotográficas em fases diferentes do tratamento. A documentação fotográfica foi feita pré e 4 meses após o término do tratamento.

Em 15 pacientes foram realizadas biópsias de pele da região pré-auricular direita em área acometida pelo fotoenvelhecimento, utilizando “punch” descartável nº4, após anestesia infiltrativa com lidocaína 2% sem vasoconstrictor. A sutura foi feita com fio mononylon 6.0 e os pontos retirados com 5 dias. Parte dos fragmentos de pele foram imersos em solução de formalina 10% em tampão fosfato e

encaminhados ao Laboratório de Músculo Esquelético da HC-FMUSP – Laboratório de Investigação Médica (LIM) 41 e a outra parte ao Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan, São Paulo, SP (sem solução de formalina). Após 4 meses do início do tratamento com laser foram realizadas novas biópsias na área pré-auricular esquerda das 15 pacientes.

3.4 Tratamento

Quinze pacientes foram submetidos a 3 sessões, com intervalo mensal, na região da face, com o aparelho de Laser Erbium Glass fracionado 1550nm (Sellas Evo®), energia de 70 mJ, densidade de 100 cm², ponteira de 50 x 50mm. Utilizou-se o Freddo® equipamento para resfriamento da pele durante e depois da aplicação do laser.

Na aplicação do laser não é necessário utilizar gel sobre a pele, a aplicação foi feita, em toda a face, em forma de carimbo, utilizando diversas formas de figuras geométricas (fornecido pelo equipamento) de acordo com a área tratada, sendo os disparos adjacentes um ao outro, evitando sobreposição (Figura 2).

Figura 2. Técnica de aplicação

Óculos de proteção foram utilizados pelo paciente e pelo pesquisador durante as aplicações.

Para alívio do eritema e da ardência decorrentes da aplicação, utilizou-se o equipamento Freddo® para resfriar a pele e compressas geladas.

Entre as sessões, as pacientes foram instruídas a utilizar medidas de fotoproteção, como evitar exposição direta ao sol e usar bloqueador solar.

3.5 Critérios de avaliação clínica

As fotografias clínicas antes e depois, de cada paciente, foram avaliadas por 3 especialistas em Dermatologia. Os observadores foram orientados a preencher um formulário (Anexo 5) e assinalar um X em:

- Melhora Discreta: se houve pequena melhora do aspecto da pele:
textura, clareamento, rugas e flacidez.
- Melhora Moderada: se houve uma melhora razoável do aspecto da pele:
textura, clareamento, rugas e flacidez.
- Melhora intensa: se houve uma grande melhora do aspecto da pele:
textura, clareamento, rugas e flacidez.

A avaliação do paciente foi determinada pelo grau de satisfação estipulado numa nota de 0 a 10.

3.6 Avaliação dos efeitos colaterais

A avaliação dos efeitos colaterais do tratamento foi feita imediatamente após a realização de cada sessão e durante 15 dias.

a. Eritema /edema /ardência/crosta/aspereza

Observou-se a presença ou ausência de eritema, edema, ardência, crosta e aspereza após cada sessão.

b. Grau de dor

O grau de dor foi avaliado durante cada sessão, perguntando ao indivíduo sobre a intensidade da dor sentida durante a aplicação do laser. Foi atribuída uma classificação de leve, moderada e intensa.

3.7 Critério de avaliação histopatológica e imuno-histoquímica

As biópsias foram fixadas por 24 horas em solução de formalina 10% em Tampão Fosfato 0,1M. A seguir foram desidratadas e embebidas em parafina para estudo histológico e imuno-histoquímico. Dos blocos de parafina foram obtidos cortes histológicos de três micrômetros de espessura, que seguiram técnicas imuno-histoquímicas para estudo da expressão da imunoreatividade da pele e técnicas histoquímicas para estudo dos componentes fibrosos, fibras colágenas e elásticas da derme. Cortes histológicos de 3 micrômetros de espessura também foram corados pelo hematoxilina-eosina (HE) para avaliação histopatológica.

3.7.1 Fibras colágenas e elásticas

Cortes histológicos da pele das pacientes nas fases pré e 4 meses do início do tratamento, foram submetidos à coloração pelo método de Picrosirius a 0.2% (Sirius Red, Direct Red 80, C. I. 35780, Aldrich, Milwaukee, WI) dissolvido em solução aquosa de ácido pícrico saturado. Para evidenciar as fibras elásticas, os cortes histológicos foram submetidos à coloração pelo método da fucsina-resorcina de Weigert com oxidação prévia pela oxona 1% (2KHSO₅. KHSO₄. K₂SO₄, Du Pont Co.)⁽²⁸⁾.

3.7.2 Imuno-histoquímica

Cortes histológicos seriados de 3 µm de espessura dos blocos de parafina seguiram para a reação de imuno-histoquímica segundo o método do complexo avidina-biotina-peroxidase⁽²⁹⁾.

Os cortes histológicos foram recolhidos em lâminas de vidro previamente tratadas com 3-aminopropiltrietoxissilano (Sigma A-3648 USA), utilizado para garantir melhor adesão do corte à lâmina. As lâminas, contendo os cortes, foram deixadas por 24 horas em estufa a 60°C para iniciar a desparafinação, que foi completada com banho em xilol quente e frio. Em seguida, foram submetidas à hidratação em banhos de etanol em graduação decrescente e finalmente água destilada.

Para avaliação do ICAM-1 utilizou-se recuperação antigênica com alta temperatura em Tampão TRIS-CITRATO pH 7.2. A seguir procedeu-se ao bloqueio da peroxidase endógena com água oxigenada (3% - 10 volumes) com quatro banhos de 5 minutos cada. As lâminas com os espécimes foram lavadas com água corrente e

destilada e com solução salina tamponada com fosfato (PBS-phosphate buffered saline) 0,01M pH 7,4 por 5 minutos.

Antes da incubação com anticorpo primário realizou-se o bloqueio de proteínas com “Protein Block Serum-Free” (DAKO X909, EUA) e depois bloqueio com Avidina e Biotina com os Kits DAKO Biotin Bloking por 15 minutos e DAKO Avidin Bloking, também, por 15 minutos. Em seguida, a incubação com os anticorpos primários na diluição: ICAM-1 1/100, que foi diluído em tampão PBS contendo albumina bovina (BSA) 1% (SIGMA A 9647 USA) e ázida sódica (NaN₃) 0,1%. Incubou-se por 60 minutos a 37°C, a 4°C em câmara úmida. Após a incubação, as lâminas com os espécimes eram lavadas em tampão PBS com três trocas de 2 minutos cada.

Para o anticorpo secundário biotilado, a incubação foi realizada com o Kit “LSAB Plus-HRP” (Dako, USA), lavando-se após em tampão PBS com três trocas de 3 minutos cada.

A revelação foi realizada em solução de substrato cromógeno, DAB 3,3 diaminobenzidina tetrahidrocloreto do kit “LiquidDAB + Substrate Chromogen System” (DAKO). A seguir, lavou-se o material em água corrente e destilada por 3 minutos e contracorou-se com hematoxilina de Harris por 1 minuto.

As lâminas com os espécimes foram lavadas novamente em água corrente e destilada, imersas duas vezes em água amoniacal (solução aquosa de hidróxido de amônia 0,5%) e lavadas outra vez em água corrente e destilada. Em seguida, foram desidratadas em etanol com graduação crescente e montaram-se novas lâminas com Entellan (Merk 107961, Germany).

3.7.3 Avaliação histomorfométrica para fibras colágenas, elásticas e vasos ICAM +

As lâminas submetidas à histoquímica para fibras colágenas e elásticas e para a imuno-histoquímica foram analisadas sob microscópio de luz Zeiss com objetiva de 20 aumentos e ocular de 10 aumentos. A avaliação quantitativa foi realizada com auxílio de Sistema Analisador de Imagem (Kontron Eletronic 300, ZEISS).

A estação de trabalho consiste de microscópio Zeiss trinocular, 1 vídeo-câmera colorida (SONY CCD - Iris), com placa digitalizadora de imagens, um microcomputador com processador Pentium 133MHz, IBM-PC compatível, operando em ambiente Windows 95[®]-32 bits. As imagens obtidas em 10 campos microscópicos foram digitalizadas com auxílio do software, proporcionando a possibilidade de compartilhamento de dados com o processador de textos (Microsoft Word[®]) e planilha eletrônica (Microsoft Excel[®]). A utilização deste programa proporcionou análise, tratamento, interpretação e a obtenção de valores de mensuração das estruturas com todas as variáveis e a distribuição automática dos dados.

A transmissão óptica foi quantificada em suas medidas originais, transformando a medida da imagem digitalizada, o Pixel, em medida micrometrada. Para tal utilizamos a calibração de Pixel em micrômetros. A calibração das imagens foi realizada para imagens obtidas em aumentos de 10, 20, 40 e 100 vezes. O fator de calibração (CF) é calculado automaticamente em pixels e este fator foi utilizado pelo software para os cálculos correspondentes em micrômetros. As imagens foram analisadas pelo software Kontron 300 (Zeiss) para determinação de área, contagem de partículas, contendo ferramenta que permite identificar determinada estrutura, colocá-la em evidência e automatizar sua marcação.

Após aquisição da imagem com objetiva de 20x e ocular de 10x, utilizamos o recurso de “threshold” para marcar as estruturas a serem quantificadas. Em seguida, empregamos um procedimento de macro desenvolvido para: contagem, mensuração e quantificação da expressão das fibras colágenas, elásticas e anti-ICAM existente em cada imagem analisada. Esta rotina semiautomatizada foi realizada em cada campo da lâmina em estudo, sendo 10 campos por lâmina. Os resultados obtidos em cada campo correspondentes à área percentual de fibras, ou seja, fração de área, foram arquivados em planilha Excel para posterior análise estatística. Em cada campo analisado foi também quantificada a área tecidual analisada. A avaliação do anti-ICAM foi obtida pela fração de área que os vasos positivos ocupam numa determinada área da derme (mm²).

3.7.4 Análise das fases do ciclo celular por citometria de fluxo

Neste projeto foi utilizada a metodologia descrita por Vindelov et al ⁽³⁰⁾ onde as células foram distribuídas nas diferentes fases do ciclo celular pelo teor ou quantidade de Iodeto de Propídeo (PI) incorporado à célula e determinado em citometria de fluxo.

Foram adicionados em placas de Petri de 2 cm² (Nunc, Brand Products, Germany) 1 mL da suspensão das células da derme na concentração de 1×10^6 células/mL e tratadas com 30 mg/mL de solução de tripsina por 10 minutos à temperatura ambiente e inativada em seguida com 5 g/L do inibidor de tripsina e 0,1 g/L de ribonuclease – A. As células foram incubadas em solução de PI (2 mg/mL, Sigma), marcador fluorescente para a avaliação da quantidade e integridade do DNA nas fases do ciclo celular.

A distribuição das fases do ciclo celular foi realizada em citômetro de fluxo FACScalibur (*Fluorescence Activated Cell Analyser* – Becton & Dickinson, USA). Os resultados obtidos pelo programa de aquisição Cell-Quest adquiridos no citômetro foram analisados pelo software WinMDI 2,8 FACS. A aquisição da população celular, em média de 10.000 eventos foi realizada pelo programa “Cell Quest” (BD) e o conteúdo de DNA medido em intensidade de fluorescência. Os resultados foram expressos em porcentagem média de células distribuídas nas diferentes fases do ciclo celular: G0/G1, S e G2/M, assim como o percentual de DNA fragmentado.

3.7.5 Análise do potencial elétrico da membrana mitocondrial por citometria de fluxo

Para a análise das mitocôndrias e seu potencial proto-iônico, as células foram incubadas com Rodamina (Rh-123 - Molecular Probes®), por 30 minutos em estufa de cultura CO₂ 5% umidificada à 37° C. A solução estoque de Rh-123 foi diluída em metanol e as diluições de incubação foram realizadas em meio de cultura contendo: sacarose 1,25mM, cloreto de potássio 65 mM, fosfato de potássio 2mM, cloreto de magnésio 1mM, EGTA 0,1mM, Hepes-KOH 10 mM e succinato 5 mM, pH 7,4. A análise e aquisição das modificações do potencial elétrico da membrana mitocondrial foram realizadas em citômetro de fluxo FACScalibur (Becton-Dickinson, USA) e os histogramas da intensidade de fluorescência FL-1 foram adquiridos pelo programa Cell Quest.

3.7.6 Determinação da atividade da caspase-3 por citometria de fluxo

A caspase-3, atividade nas células da epiderme, foi determinada por citometria de fluxo utilizando o ensaio NucView. O NucView TM 488 da caspase-3 substrato (Biotium Inc., Hayward, CA, EUA) é uma célula membrana permeável substrato caspase concebido para detectar a atividade da caspase-3. O substrato é clivado pela caspase-3 no citoplasma das células apoptóticas, libertando um corante de ADN fluorescente que é capaz de introduzir os núcleos e mancha do ADN. Aliquotas de 100 ul das suspensões de células a partir de amostras de biópsias antes e após o tratamento com laser não ablativo foram transferidas para tubos de citometria de fluxo e 5 ul de NucView TM 488 de substrato caspase-3 foi adicionada às células. Em seguida, as células foram incubadas a sala temperatura no escuro durante 30 minutos antes da análise por citometria de fluxo usando o FACScalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA). Gráficos de pontos tipo “dot plot” dos eventos foram registrados no canal FL2 e 50.000 eventos foram adquiridos para cada amostra de 15 experimentos independentes.

3.7.7 Expressão de receptores por citometria de fluxo

A citometria de fluxo é capaz de distinguir as células individuais por dimensão, granularidade e positiva ou citoplasmático expressão negativa de receptores diferentes que utilizam fluorocromos, que são conjugados com anticorpos capazes de reconhecer as proteínas de interesse.

A expressão do receptor foi avaliada pela técnica de imunofluorescência, utilizando um citômetro de fluxo FACScalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA). O detector de fluorescência vermelha foi compensado eletronicamente para os níveis

de base, utilizando células coradas apenas com os respectivos anticorpos conjugados com fluoresceína.

Ficoeritrina (PE)-anti-humano marcado CD34, anti-interleucina, anti-fator de crescimento transformador e anticorpos monoclonais (mAbs) (Abcam, Cambridge, UK) foram utilizados para a detecção. PE conjugada a IgG1 anticorpos (Abcam, Cambridge, UK) foram utilizados como controle isotipo para inespecífica vinculativo. Os dados foram coletados de 10.000 eventos, considerando-se as propriedades de dispersão de luz específicas que permitiram a análise da expressão específica do receptor.

3.7.8 Microscopia eletrônica de varredura em tecidos

Na microscopia eletrônica de varredura os sinais de maior interesse para a formação da imagem são os elétrons secundários e os retro espalhados. À medida que o feixe de elétrons primários vai varrendo a amostra estes sinais vão sofrendo modificações de acordo com as variações da superfície. Os elétrons secundários fornecem imagem de topografia da superfície da amostra e são os responsáveis pela obtenção das imagens de alta resolução, já os retro espalhados fornecem imagem característica de variação de composição.

As amostras foram acondicionadas individualmente e mantidas imersas em solução de glutaraldeído a 2,5%, com tampão cacodilato de sódio 0,1M e pH 7,4 durante 8 horas em temperatura ambiente durante 7 dias.

As análises das amostras foram realizadas no Departamento de Cirurgia – Laboratório de Microscopia Eletrônica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – USP.

Após a fixação, as amostras foram submetidas a uma nova lavagem em solução tampão de cacodilato de sódio e desidratadas em concentrações crescentes de álcool etílico de 30 a 100% e acetona P. A. durante 15 minutos e repetidas por 3 vezes e secas em secador de ponto crítico, utilizando-se dióxido de carbono líquido. Em seguida as amostras foram fixadas em porta espécime, com fita condutiva de cola de carbono e metalizadas no metalizador com uma camada de ouro e paládio de 35 nm de espessura, em *íon sputter coater* durante 2 minutos. Na sequência, cada amostra foi avaliada no microscópio eletrônico de varredura operado com 15 KV (PHILIPS - EDAXx20 KV). As imagens foram gravadas em arquivo digital.

3.8 Análise Estatística

Os dados quantitativos histomorfométricos, relativos à fração de área de fibras colágenas, elásticas e à fração de área de vasos ICAM -1 positivos foram analisados através de Estatística Descritiva: média, desvio padrão, valor mínimo e máximo e mediana. Para avaliar se um mesmo tratamento promoveu diferença nas pacientes, compararam-se os dados pré e 4 meses após o início do tratamento. Foram realizados testes não paramétricos pareados de Wilcoxon, com valor significativo $p < 0,05$. As análises estatísticas da expressão dos receptores, das fases do ciclo celular e do potencial elétrico da membrana mitocondrial por citometria de fluxo foram obtidas pelo método de variância – ANOVA com teste comparativo múltiplo de Tukey. Os valores significantes foram considerados com $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) e $p < 0,001$ (***)

4 Resultados

4.1 Avaliação Clínica

4.1.1 Avaliação de melhora clínica

Os resultados da avaliação clínica encontram-se na tabela 1. A seguir são apresentadas as fotografias (frente e perfil) das pacientes que receberam tratamento mensal com laser durante 3 meses (Figuras 3 a 6). A avaliação clínica foi realizada nos 15 casos.

Tabela 1. Descrição das pacientes segundo a idade, fototipo, classificação de Glogau ⁽²⁷⁾ e avaliação clínica através da comparação de fotografias pelos três observadores (4 meses)

Casos	Idade	Fototipo	Classificação (Glogau)	Avaliador (4 meses)		
	(anos)			AV1	AV2	AV3
1	60	III	III	MI	MM	MI
2	55	III	III	MI	MM	MI
3	57	III	III	MD	MD	MD
4	48	III	III	MD	MD	MD
5	58	II	III	MM	MM	MI
6	55	III	III	MM	MM	MM
7	53	IV	III	MD	MD	MD
8	54	IV	III	MM	MD	MM
9	63	II	III	MM	MM	MM
10	48	II	III	MD	MD	MD
11	59	II	III	MM	MM	MM
12	55	IV	III	MD	MD	MD
13	60	III	III	MD	MD	MD
14	61	II	III	MI	MM	MI
15	60	II	III	MD	MD	MD

MD=Melhora discreta; MM = Melhora moderada; MI = Melhora intensa

Pré-tratamento

Após 4 meses

Figura 3. Evolução do aspecto clínico após tratamento do fotoenvelhecimento da face com laser fracionado não ablativo, mostrando melhora da textura, clareamento, rugas e flacidez da pele

Pré-tratamento

Após 4 meses

Figura 4. Evolução do aspecto clínico após tratamento do fotoenvelhecimento da face com laser fracionado não ablativo, mostrando melhora da textura, clareamento, rugas e flacidez da pele

Pré-tratamento

Após 4 meses

Figura 5. Evolução do aspecto clínico após tratamento do fotoenvelhecimento da face com laser fracionado não ablativo, mostrando melhora da textura, clareamento, rugas e flacidez da pele

Pré-tratamento

Após 4 meses

Figura 6. Evolução do aspecto clínico após tratamento do fotoenvelhecimento da face com laser fracionado não ablativo, mostrando melhora da textura, clareamento, rugas e flacidez da pele

Os resultados desta avaliação clínica foram então agrupados por porcentagem em relação ao total das pacientes para cada avaliador e dispostos em forma de gráfico de colunas. Tabela 2 e gráfico 1 correspondem a 4 meses.

Tabela 2. Resultado da avaliação clínica após 4 meses segundo os 3 observadores (15 casos)

Avaliação clínica (15 casos)	1	2	3	Média	Concordância de avaliação
Melhora Discreta	46,66%	53,33%	46,66%	48,88%	5 (33,33%)
Melhora Moderada	33,33%	46,66%	26,66%	35,56%	3 (20,00%)
Melhora Intensa	20,00%	0,0%	26,66%	15,56%	0 (6,66%)

Gráfico 1. Avaliação clínica após 4 meses dos três observadores (AV1, AV2 e AV3)

(MD: Melhora Discreta, MM: Melhora Moderada e MI: Melhora Intensa)

Após 4 meses houve melhora clínica moderada e intensa em 51,12% dos casos.

4.1.2 Avaliação do grau de satisfação das pacientes

As pacientes foram solicitadas a dar uma nota subjetiva de 0 a 10 ao tratamento, para avaliar qual o grau de satisfação delas quanto à terapêutica empregada. O nível de satisfação das pacientes foi 8,8. Todas as pacientes relataram clareamento, melhora das rugas e textura da pele. A tabela 3 mostra as notas de melhora das pacientes e o gráfico 2 mostra as % correspondentes.

Tabela 3. Resultado da avaliação do grau de satisfação das pacientes

Casos	Nota do paciente
1	10
2	10
3	8
4	7
5	10
6	10
7	9
8	8
9	10
10	5
11	10
12	7
13	9
14	9
15	10

Gráfico 2. Grau de satisfação das pacientes

4.1.3 Avaliação dos efeitos colaterais

A avaliação dos efeitos colaterais nas 15 pacientes com fotoenvelhecimento da face durante o tratamento foram: edema (11/15), eritema (14/15), ardência (9/15), aspereza (7/15) e prurido (1/15). A tabela 4 apresenta os tipos do efeito colateral de cada uma das pacientes tratadas. Estes dados foram agrupados em % e estão representados no gráfico 3.

Tabela 4. Efeitos colaterais decorrentes do tratamento

Casos	Edema	Eritema	Ardência	Aspereza	Prurido	Totais
1	x	x	x	x		4
2	x	x	x	x		4
3	x	x	x	x		4
4	x	x	x	x		4
5		x	x		x	3
6	x	x	x	x		4
7		x				1
8		x	x			2
9		x		x		2
10	x	x				2
11	x	x		x		3
12	x	x				2
13	x		x			2
14	x	x				2
15	x	x	x			3
TOTAL	11	14	9	7	1	42

Gráfico 3. Avaliação dos efeitos colaterais

4.1.4 Avaliação do grau de dor segundo as pacientes

Durante o tratamento as pacientes relatavam se estavam apresentando dor com a aplicação do laser na graduação de leve (L), moderada (M) ou intensa (I). Os dados apresentados na tabela 5 são os resultados obtidos das 3 sessões de tratamento a que estas pacientes foram submetidas. Os dados foram transformados em % e estão apresentados no gráfico 4.

Tabela 5. Avaliação de dor durante o tratamento

Caso	Dor
1	M
2	M
3	M
4	I
5	M
6	M
7	I
8	M
9	M
10	M
11	M
12	M
13	M
14	L
15	L

L = leve 2 (13,33%); M = moderada 11 (73,34%); I = Intensa 2 (13,33%)

Gráfico 4. Avaliação do grau de dor

4.2 Análise histológica

As biópsias de pele das pacientes foram analisadas no microscópio de luz Zeiss e as características diferenciais foram documentadas por captura de imagem.

O estudo histopatológico (fibras colágenas e elásticas) pré e 4 meses após o tratamento foi realizado em 15 casos.

4.3 Análise histomorfométrica das fibras colágenas

A quantificação do colágeno da derme foi avaliada por histomorfometria com auxílio de Sistema Analisador de Imagem. Observou-se que a derme das biópsias de pele pré-tratamento apresentavam pequena quantidade de colágeno, com fibras desordenadas e pequenas. As biópsias de pele 4 meses após o tratamento mostraram

aumento de colágeno na derme, com ordenação paralela dessas fibras em relação à epiderme (Figuras 7 a 13). Os valores da fração de área de colágeno (%COL) dos casos estudados encontram-se na tabela 6. A tabela 7 mostra a Estatística Descritiva: média, desvio padrão, valores máximo e mínimo e a mediana da fração de área de colágeno das biópsias de pele.

Figura 7. A- Biópsia de pele pré-tratamento. Observa-se epiderme sem alterações histológicas e derme com espessura preservada contendo fibras colágenas densas. HEx40. B- Biópsia de pele após tratamento. Observa-se epiderme sem alterações histológicas. Derme mostra discreto aumento de colágeno. HEx40

Figura 8. A- Pré-tratamento. Observa-se derme com fibras colágenas desorganizadas. B- Após tratamento observa-se melhor organização das fibras colágenas seguindo direção longitudinal paralela à epiderme. Picrosirius x100

Figura 9. A- Pré-tratamento. Observa-se derme com fibras colágenas densas e entremeadas por tecido adiposo perianexial. B- Após tratamento observa-se derme espessa com fibras colágenas compactas e ausência de tecido adiposo perianexial. HEx40

Figura 10. A- Pré-tratamento. Derme mostra fibras colágenas desorganizadas. B- Após tratamento a derme mostra rearranjo das fibras colágenas que apresentam uma distribuição mais homogênea. Picrosirius x100

Figura 11. A- Pré-tratamento. A derme mostra colágeno denso. B- Após tratamento a derme mostra discreto aumento de colágeno. HEx40

Figura 12. A- Pré-tratamento. Derme mostra colágeno denso e tecido adiposo perianexial. B- Após tratamento a derme mostra discreto aumento de colágeno. HEx40

Figura 13. A- Pré-tratamento. Observa-se derme com colágeno denso e entremeada na profundidade por tecido adiposo. B- Após tratamento observa-se aumento da espessura da derme por colágeno denso. HEx40

Tabela 6. Valores individuais da fração de área de colágeno (%) na derme das biópsias de pele estudadas

Casos	% Colágeno Pré	% Colágeno 4 meses
C1	43,44	48,28
C2	33,99	43,53
C3	43,97	47,68
C4	39,60	52,01
C5	34,51	36,46
C6	46,93	37,43
C7	47,77	40,80
C8	38,99	43,92
C9	27,04	29,26
C10	22,60	30,70
C11	54,09	38,48
C12	35,60	37,44
C13	42,16	49,72
C14	37,49	44,32
C15	37,02	44,48

Tabela 7. Estatística Descritiva da fração de área de colágeno na derme

Estatística	%Colágeno pré	% Colágeno 4 meses
Média	39,02	41,63
Desvio Padrão	8,00	6,67
Max	54,09	52,01
Min	22,60	29,26
Mediana	38,99	43,53

4.3.1 Análise Estatística comparativa da Fração de Área de Fibras Colágenas (%COL) na derme entre duas fases estudadas

Para avaliar os efeitos de três sessões de tratamento com laser nas Fibras Colágenas da derme em um mesmo paciente, comparamos os valores da fração da área de fibras colágenas pré e 4 meses após início do tratamento de 15 casos estudados. Foi realizado teste não paramétrico pareado de Wilcoxon. Não houve diferença significativa ($p=0,16$). A quantificação das fibras colágenas mostrou aumento médio de 6,68% proporção média de fibra colágena na derme após 4 meses de tratamento (Gráfico 5).

Gráfico 5. Gráfico representando a análise da média da %COL na derme em duas fases diferentes do estudo

4.4 Análise das fibras elásticas na derme

A quantificação das fibras elásticas da derme das biópsias de pele foi avaliada por histomorfometria com auxílio de Sistema Analisador de Imagem. A derme das biópsias de pele pré-tratamento mostraram fibras elásticas espessas e curtas, por vezes encurvadas e desordenadas ou dispostas em agrupamentos, não havendo distribuição homogênea entre as fibras colágenas (Figuras 14 e 15). Com o auxílio do Sistema Analisador de imagens pudemos marcar estas fibras elásticas e desse modo quantificá-las.

A tabela 8 mostra os valores individuais da fração de área de fibras elásticas (%FE) dos casos estudados. A tabela 9 mostra a média, desvio padrão, valores máximo e mínimo e mediana da fração de área de fibras elásticas das biópsias de pele estudadas.

Figura 14. A- Derme mostra fibras elásticas homogeneamente distribuídas, sendo algumas mais espessas e encurvadas e por vezes menores. Weigert x100. Em maior aumento observam-se fibras elásticas pequenas e rompidas em meio a fibras colágenas. Weigert x400. B- Após tratamento, observam-se fibras elásticas homogeneamente distribuídas. Em maior aumento observam-se fibras finas e alongadas em meio a fibras colágenas. Weigert x400

Figura 15. A- Pré-tratamento. Na derme observam-se fibras elásticas mais espessas por vezes amontoadas em uma área. Weigert x100. Em grande aumento observam-se fibras elásticas pequenas, fragmentadas e, por vezes, encurvadas. Weigert x400. B- Após tratamento observa-se distribuição mais homogênea das fibras elásticas na derme reticular. Weigert x100. Em grande aumento observam-se fibras elásticas mais finas, alongadas e que acompanham a direção das fibras colágenas. Weigert x400

Tabela 8. Valores individuais da fração de área de Fibras Elásticas na derme das biópsias de pele estudadas

Casos	% Fibras Elásticas Pré	% Fibras Elásticas 4 meses
C1	6,21	4,98
C2	10,13	6,61
C3	11,91	9,78
C4	4,81	3,57
C5	10,26	8,76
C6	5,51	8,62
C7	7,81	2,41
C8	10,28	2,10
C9	5,97	3,39
C10	8,04	20,70
C11	11,38	5,20
C12	10,87	14,97
C13	33,11	19,77
C14	7,13	11,35
C15	3,53	5,94

Tabela 9. Estatística Descritiva da fração de área de Fibras Elásticas na derme

Estatística Descritiva	%Fibras Elásticas pré (15 casos)	% Fibras Elásticas 4 meses pós (15 casos)
Média	9,80	8,54
Desvio Padrão	6,95	5,91
Max	33,11	20,70
Min	3,53	2,10
Mediana	8,04	6,61

4.4.1 Análise Estatística comparativa da Fração de Área de Fibras Elásticas (%FE) na derme entre duas fases estudadas

Para avaliar os efeitos de três sessões de tratamento com laser nas fibras elásticas da derme em um mesmo paciente, comparamos os valores da fração da área de fibras elásticas pré e 4 meses após início do tratamento de 15 casos estudados. Foi realizado teste não paramétrico pareado de Wilcoxon, observando não haver diferença significativa ($p=0,42$). A quantificação das fibras elásticas mostrou redução de 12,85 % proporção média de fibra elástica na derme após 4 meses de tratamento (Gráfico 6).

Gráfico 6. Gráfico representando a análise da média da %FE na derme em duas fases diferentes do estudo

($p=0,42$)

4.5 Análise das reações imuno-histoquímicas para ICAM-1

Em relação ao anticorpo ICAM-1, que evidencia as células endoteliais dos vasos na derme, comparamos os valores obtidos pré e após 4 meses do início do tratamento em 12 casos. Os resultados individuais da fração de área (%ICAM) ocupada por estes vasos na derme de cada um dos casos estudados estão revelados na tabela 10. Houve aumento de ICAM-1 em 4 meses. Os valores obtidos pela estatística descritiva estão especificados na tabela 11. A figura 16 mostra células endoteliais positivas para ICAM-1 evidenciando os vasos da derme.

Figura 16. A- Pré-tratamento. A derme mostra vasos capilares marcados pela reação de imuno-histoquímica para ICAM. B- Após tratamento observa-se discreto aumento da quantidade de vasos capilares marcados pela reação de imuno-histoquímica para ICAM x400

Tabela 10. Valores individuais da fração de área ocupada pelos vasos dérmicos ICAM+ nas biópsias de pele estudadas

Casos	%ICAM / Pré	%ICAM / 4meses
1	1,23	1,35
2	0,74	1,02
3	1,36	0,56
4	0,28	0,51
5	1,18	1,40
6	0,20	0,52
7	0,59	0,27
8	0,50	0,77
9	0,71	1,02
10	0,27	0,57
11	0,91	0,22
12	0,12	0,13

Valores= fração de área de vasos ICAM+ (%)

Tabela 11. Estatística Descritiva de %ICAM nos vasos da derme

Estatística	%ICAM pré	%ICAM 4 meses
Média	0,67	0,70
Desvio Padrão	0,42	0,42
Max	1,36	1,40
Min	0,12	0,13
Mediana	0,65	0,56

4.5.1 Estatística Comparativa entre duas fases do estudo para fração de área de vasos na derme (ICAM-1+)

Comparando-se as duas fases do estudo em 12 pacientes, pré e 4 meses após o início do tratamento, verificamos que os valores da % da expressão do ICAM-1, não foram estatisticamente significante pelo teste não paramétrico pareado de Wilcoxon ($p=0,67$). Entretanto, a quantificação da % do ICAM-1 mostrou aumento médio de 4,47% nos vasos da derme após 4 meses de tratamento com 3 sessões de laser (Gráfico 7).

Gráfico 7. Gráfico representando a análise da média do %ICAM na derme em duas fases diferentes do estudo

4.6 Análise das fases do ciclo celular por citometria de fluxo

A análise da distribuição das populações celulares nas diferentes fases do ciclo celular por citometria de fluxo das amostras pré e após tratamento foram comparadas e evidenciaram alterações significativas. As populações celulares identificadas foram: a população no quadrante M1 = células em divisão celular (G2/M); no quadrante M2 = células em síntese (fase S); no quadrante M3 = células quiescentes ou senescente (G0/G1) e uma população sub-diplóide localizado no quadrante M4 = DNA fragmentado. As médias $\pm$ desvio padrão das amostras estudadas estão apresentadas nos gráficos 8, 9 e tabela 12.

Os valores obtidos mostraram diferenças significativas nas populações celulares distribuídas nas fases S, G0/G1 e DNA fragmentado. As amostras após o laser apresentaram aumento na fase S, diminuição na fase G0/G1 e aumento de DNA fragmentado. Estes resultados demonstram o efeito do laser aumentando significativamente a capacidade de síntese.

Gráfico 8. Gráficos representando o histograma das fases do ciclo celular obtido pela citometria de fluxo

Gráfico 9. Gráficos representando a distribuição da quantidade de DNA/células nas diferentes fases do ciclo celular

Tabela 12. Média $\pm$ dp das populações celulares distribuídas nas fases do ciclo celular

	DNA fragmentado	G0/G1	Fase S	G2/M
Pré - Laser	9,6 $\pm$ 3,6	76,9 $\pm$ 5,3	5,7 $\pm$ 1,2	6,8 $\pm$ 2,5
Após - Laser	40,1 $\pm$ 19,7	43,3 $\pm$ 19,3	21,3 $\pm$ 8,2	9,8 $\pm$ 4,3

4.7 Análise do potencial elétrico da membrana mitocondrial por citometria de fluxo

Potencial elétrico e funcional da membrana mitocondrial foi realizado pela marcação com a sonda rodamina 123. A Rodamina-123 (Rh-123) é um fluorocromo específico para a marcação mitocondrial em células vivas. O fato de ser um fluorocromo catiônico carregado positivamente permite que seja atraído pelo elevado potencial elétrico negativo presente na membrana mitocondrial, incorporando-se no interior destas organelas. Alterações na integridade mitocondrial podem ser detectadas através do aumento da fluorescência verde citosólica, indicando uma difusão da Rh-123 da mitocôndria para o citosol ⁽³¹⁾. A Rh-123 é um componente catiônico que excita a 488 nm e emite fluorescência verde a 515-575 nm ⁽³²⁾. A aquisição dos histogramas do potencial elétrico da membrana mitocondrial avaliados pela incorporação da Rh-123 foram realizadas em citômetro de fluxo e as imagens da intensidade de fluorescência FL-1 adquirida pelo programa *Cell Quest* e analisadas no programa WinMDI 2,8. Os resultados mostraram que a aplicação do laser aumentou a atividade funcional do potencial elétrico mitocondrial, como também promoveu o aumento significativo do número total de mitocôndrias. As diferenças significativas estão apresentadas nos gráficos 10, 11, 12 e tabelas 13 e 14.

Gráfico 10. Gráficos do tipo “dot plot” e histograma do potencial elétrico das mitocôndrias

Gráfico 11. Gráficos de barras das médias do percentual de mitocôndrias obtidas por citometria de fluxo

Tabela 13. Média ± dp da distribuição da quantidade de mitocôndrias

	Mitocôndrias Hiperativas	Mitocôndrias Ativas	Mitocôndrias Infuncionais
Pré - Laser	0,56 ± 0,46	83,4 ± 5,5	14,3 ± 5,3
Após - Laser	26,8 ± 14,9	72,1 ± 16,4	5,0 ± 1,9

Gráfico 12. Gráficos representando a % da distribuição das células que apresentam mitocôndrias ativas e hiperativas

Tabela 14. Média $\pm$ dp das mitocôndrias ativas e hiperativas obtidas por citometria de fluxo

	Mitocôndrias - Ativas	Mitocôndrias - Hiperativas
Pré - Laser	89,3 $\pm$ 1,9	10,5 $\pm$ 1,8
Após - Laser	55,0 $\pm$ 14,5	44,7 $\pm$ 13,6

4.8 Determinação da atividade da caspase-3 fosforilada por citometria de fluxo

A apoptose ou a morte celular programada é um processo comum, que ocorre tanto em situações patológicas, contribuindo para fenômenos de inflamação e de disfunção orgânica, como em situações fisiológicas de reparo e regeneração tecidual. Neste processo, diversas proteínas são ativas e clivadas, entre elas as caspases. Caspases são proteases que desempenham um papel central na apoptose e, consequentemente, constituem alvos farmacologicamente ativos para a inibição e/ou potenciação da morte celular. Foram avaliados os mecanismos de apoptose e morte celular após a aplicação do laser Erbium Glass fracionado não ablativo na pele das pacientes com fotoenvelhecimento e o envolvimento da caspase-3 neste processo. Os resultados obtidos por citometria de fluxo nas amostras das pacientes pré e após aplicação do laser Erbium Glass não mostraram diferenças significativas na expressão da forma ativa da caspase-3, portanto não houve expressiva morte celular por esta via de sinalização (Gráficos 13 e 14).

Gráfico 13. Gráficos do tipo “dot plot” obtidos por citometria de fluxo representando a atividade da Caspase-3

Gráfico 14. Gráfico representando a média $\pm$ dp da porcentagem da expressão Caspase-3

4.9 Receptores de expressão de membrana celular por citometria de fluxo

4.9.1 Receptor interleucina -1 (IL-1)

A família da interleucina IL-1 é constituída por onze membros que partilham uma estrutura beta-trifólio conservada e se ligam a receptores pertencentes à família de receptores de IL-1. São capazes de ativar vias de sinalização intracelulares ligando-se a uma subunidade do receptor que ao ser recrutado forma um complexo do receptor ativo. As cascatas de sinalização desencadeadas pela ativação da IL-1 compreendem a transcrição do fator NF-kappa B, que leva à expressão das citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e mediadores secundários da resposta inflamatória. A aplicação do laser Erbium Glass fracionado não ablativo nas amostras após tratamento mostrou aumento significativo ($p=0.0079$) na expressão do receptor de IL-1, quando comparado ao grupo de amostras pré-tratamento, demonstrando o papel modulatório da inflamação do laser na pele fotoenvelhecida. O aumento significativo da IL-1 supostamente aumenta a transcrição de fatores de crescimentos, como o NF-kappa B, capaz de interagir com o microambiente cutâneo, induzir remodelamento e proliferação celular (Gráficos 15 e 16).

Gráfico 15. Gráfico do tipo “dot-plot” obtido por citometria de fluxo da população celular da IL-1r

Gráfico 16. Gráfico representando a média $\pm$ dp da porcentagem de expressão do receptor de IL-1

*Diferenças significativas obtidas pelo teste de variância de ANOVA

4.9.2 Receptor CD 34

O marcador CD34 é uma glicoproteína transmembrana expressa em células progenitoras hematopoéticas, em células endoteliais, fibroblastos embrionários e em algumas células do tecido nervoso fetal e adulto. É uma glicoproteína envolvida na adesão celular e na ligação das células-tronco hematopoéticas e precursores à matriz extracelular ou ao estroma. Nas amostras pré e após aplicação do laser Erbium Glass, não houve diferenças significativas na expressão deste marcador obtido por citometria de fluxo (Gráficos 17 e 18). Não há presença de células endoteliais, lesões endotélio vasculares ou a proliferação de precursores endoteliais após a aplicação do laser.

Gráfico 17. Gráfico do tipo “dot plot” obtido por citometria de fluxo, da população celular do CD34

Gráfico 18. Gráfico representando a média $\pm$ dp da porcentagem de expressão do marcador CD34

NS = não significativo

4.9.3 Receptores de TGF- β

A superfamília dos receptores de TGF-beta é composta por dois grupos, serina / treonina quinase tipo I e II. Estas quinases são proteínas transmembrânicas do tipo I, e os dois subgrupos são distinguidas pela presença de um domínio na membrana rico em serina-glicina. Estão envolvidos na sinalização parácrina e podem ser encontrados em muitos tipos de tecidos diferentes. Todos os fatores de crescimento funcionam por ligações a receptores específicos que distribuem sinais as células-alvo. Esses sinais têm dois efeitos gerais: (1) estimulam a transcrição de muitos genes que estavam silenciosos nas demais células, e (2) vários desses genes regulam a entrada de células no ciclo celular e sua passagem através dos vários estágios desse ciclo. Os resultados obtidos por

citometria de fluxo demonstraram aumento significativo ($p=0.0282$) na expressão do receptor tipo I do TFG nas amostras após a aplicação do laser Erbium Glass (Gráficos 19 e 20). Esse aumento representa os efeitos conjunto do laser no potencial proliferativo na remodelagem da matriz extracelular.

Gráfico 19. Gráfico do tipo “dot plot” obtido por citometria de fluxo da população celular do TGFR1

Gráfico 20. Gráfico representando a média $\pm$ dp da porcentagem de expressão do marcador TGFR1

*Diferenças significativas obtidas pelo teste de variância de ANOVA

4.9.4 Determinação do índice proliferativo

A proliferação celular é um processo firmemente regulado que envolve um grande número de moléculas e vias inter-relacionadas. O primeiro evento que inicia a proliferação celular é, em geral, a ligação de uma molécula de sinalização ligante, a um receptor celular específico. Como os fatores de crescimento e proteínas da matriz extracelular, conforme anteriormente determinados (IL-1, TGF- β), que induzem a resposta no aumento na proliferação celular. Foram avaliados por citometria de fluxo utilizando-se o programa *Wizard proliferative rate* a taxa de proliferação das células obtidas das amostras de fotoenvelhecimento pré e após a aplicação do laser Erbium Glass. Os resultados mostraram aumento significativo na proporção de células em proliferação ($p=0.0248$) após a aplicação do laser (Gráficos 21 e 22). Esses resultados em conjunto com a expressão dos receptores de IL-1 e TGF- α corroboram o aumento da resposta proliferativa e formação de uma neocolagenogênese induzida pelo laser Erbium Glass.

Gráfico 21. Histogramas representativos obtidos pelo programa Wizard utilizado na determinação do índice proliferativo por citometria de fluxo

Gráfico 22. Gráfico representando a média $\pm$ dp do índice proliferativo

*Diferenças significativas obtidas pelo teste de variância de ANOVA

4.10 Microscopia eletrônica de varredura

As fotomicrografias das amostras obtidas em MEV antes da aplicação do laser mostram áreas irregulares de depressões na superfície da derme, corneócitos intactos, presença de poros e áreas de baixa hidratação nas amostras pré-tratamento. Após o tratamento, a superfície de revestimento da área exposta ao meio ambiente foi significativamente reorganizada, com todas as áreas adequadas hidratadas, sem a presença de depressões ou ranhuras e com uma melhora significativa na organização da matriz extracelular. É importante ressaltar que a microbiota da pele estava presente em sua totalidade nas amostras após a aplicação do laser (Figura 17).

Figura 17. Fotomicrografias das amostras obtidas em MEV pré e após tratamento. Seta branca - sulco pré-tratamento e rugas; seta preta – corneócitos intactos e hidratados

A figura 18 mostra o resultado do MEV após aplicação do laser.

Figura 18. Fotomicrografia das amostras da derme obtidas por MEV após a aplicação do laser. Destacam-se no colchete: preenchimento do sulco e organização das fibras da MEC; Seta amarela tracejada: estrutura do poro da derme superficial; Seta verde tracejada: abertura da glândula e presença de flora bacteriana; Seta verde: microvilus e orientação das fibras de sustentação

5 Discussão

O laser Erbium Glass fracionado não ablativo 1550 nm é um método que tem sido extensivamente estudado, conforme descrito na literatura. Estes lasers agem por meio da fototermólise seletiva, cujo alvo é a água, mas utilizam padrão diferenciado de dano térmico. O fracionamento de raio laser forma colunas de lesões térmicas microscópicas na epiderme e derme, circundadas por tecido saudável, que fornecem células viáveis para a regeneração da pele. A melhora da superfície de um tecido lesado é obtida pela movimentação dos queratinócitos a partir das bordas livres, inclusive aqueles que contornam os folículos pilosos e as glândulas sudoríparas para dentro da lesão térmica ⁽³³⁾. A rápida cicatrização do laser fracionado diminui os riscos de complicações como infecções, mantendo o estímulo para neocolagênese por causar a coagulação da pele ⁽³⁴⁾.

Vários estudos mostraram a reversão do processo de envelhecimento, gerando danos dérmicos sem ablação da epiderme, após o uso do laser Erbium Glass fracionado não ablativo 1550 nm.

Os pacientes, neste estudo, relataram melhoras significativas na flacidez e mudanças na textura da pele. Uma explicação para este fenômeno envolve possivelmente o aumento da quantidade de colágeno e / ou reorganização das fibras, tornando-as mais homogêneas e mais densas. Estes resultados foram também obtidos em vários estudos utilizando lasers fracionados não ablativos ^(35,36,37).

Patriota et al. ⁽³⁸⁾, em um estudo sobre fotorrejuvenescimento não ablativo com LIP, afirmam que as alterações das fibras colágenas e elásticas são encontradas 6 meses após o tratamento. Neste estudo, observou-se mudanças histológicas na

coloração HE, com maior densidade e organização das fibras colágenas e elásticas após 4 meses do tratamento; as mudanças mais significativas ocorreram na região perifolicular e na derme papilar e reticular superior; 51,12% das pacientes apresentaram melhora clínica moderada e intensa com excelente grau de satisfação.

A utilização da quantidade adequada e da profundidade de penetração do dano fototérmico controlado pelo laser Erbium Glass fracionado não ablativo foi considerado o instrumento essencial para a indução eficaz de colágeno sintetizado ^(39,40,41).

O colágeno é uma família de proteínas estruturais, que promovem sustentação e resistência à pele e a outros tecidos. As fibras de colágeno são compostas de cadeias de proteínas, dispostas numa tripla hélice, ligando-se através de pontes de hidrogênio. Estudos em laboratório demonstram que o colágeno aquecido perde as pontes de hidrogênio e a estrutura helicoidal se transforma em uma estrutura amorfa e enrolada ao acaso. Isso leva a um encurtamento e engrossamento das fibras de colágeno, de modo que as cadeias de proteínas se dobram e assumem uma configuração mais estável. A contração do colágeno poderia ser traduzida na pele pelo efeito *skin tightening*, o mesmo que ocorre com a radiofrequência e outros métodos não invasivos para produzir *skin tightening* (pele esticada) ⁽⁴²⁾. Entretanto, a dor intensa e o atraso na resposta clínica de muitas pacientes são fatores limitantes para o uso dessa tecnologia. Na tentativa de promover o efeito *lifting*, novos aparelhos foram estudados por Ruiz Esparza ⁽⁴³⁾ utilizando laser que emite luz no comprimento de onda entre 1000 a 1800 nm e em ciclos de multissegundos, tendo demonstrado, através de fotografias, o efeito *skin tightening* em 22 pacientes. Esse efeito foi mantido após 8 meses, quando as pacientes foram novamente fotografadas.

No envelhecimento extrínseco observam-se na derme fibras colágenas finas ⁽⁴⁴⁾. Neste estudo, as fibras colágenas ficaram mais densas, grossas e organizadas após a aplicação do laser.

Manstein ⁽²⁵⁾ afirma que zonas microscópicas de coagulação de tecido (MTZ), produzida do laser fracionado na densidade desejada, é um tratamento promissor para a remodelação do colágeno. A histopatologia revelou necrose da epiderme e derme próxima à MTZ, alteração também encontrada com o aumento de DNA fragmentado. Apesar dos danos teciduais localizados, estas lesões foram bem toleradas e a reparação epidérmica foi concluída em menos de um dia.

Atualmente, o laser fracionado tem se mostrado mais eficaz para a remodelação do colágeno, uma vez que os lasers pulsados utilizam energia elevada levando a uma produção de calor indesejada. Esta remodelação dos componentes da matriz foi observada aos 3 meses com aumento de mucina na derme superficial. O aumento de mucina é marcador de rejuvenescimento da pele. Entretanto, um acompanhamento a longo prazo pode ser necessário para documentar os efeitos deste tratamento ⁽²⁵⁾.

As fases de cicatrização normal das lesões por segunda intenção são: hemostasia, inflamação, proliferação e remodelação. Nesta última fase, a matriz extracelular e os fibroblastos controlam-se mutuamente até que uma matriz estável se forme em meses ou anos ⁽³³⁾. A maioria das bandas de colágeno na derme é mista, formada por colágeno do tipo I, mas também, constituída em menor porcentagem por colágeno do tipo III e V. Durante 3 meses, desde a fase da proliferação, a síntese do colágeno tipo III, estimulada pelo fator transformador de crescimento beta (TGF- β), inicia-se antes do colágeno tipo I, mas com o tempo esta razão se inverte, pois a produção do tipo III diminui ⁽⁴⁵⁾. Laubach et al. ⁽⁴⁴⁾ encontraram evidências de

aumento da produção de colágeno tipo III, através de imuno-histoquímica, 7 dias após a fototermólise fracionada.

Uma aplicação de laser fracionado induz uma resposta na cicatrização das lesões na derme por meio de danos térmicos e a epiderme recupera rapidamente dentro de 7 dias após o tratamento. O colágeno danificado termicamente no interior da MTZ é substituído por novo colágeno dentro de 3 meses ⁽⁴⁴⁾. Os achados, desse trabalho, também concordam com o encontrado no neste estudo, em que a remodelação do colágeno ocorreu após 4 meses.

Fournier et al. ⁽⁴⁶⁾ afirmam que, em todos os processos de remodelação ou *resurfacing*, se espera que a zona Grenz se espesse pelo aumento da deposição de colágeno, com reorganização em arranjos paralelos com fibrilas compactas. Afirma, porém, que esse processo leva meses para ser visualizado, após o procedimento. O mesmo foi observado em nosso trabalho.

A análise morfométrica, conhecida por sua reprodutibilidade e objetividade, mostrou-se útil, neste estudo, para a obtenção de dados quantitativos referentes à quantificação de fibras colágenas e elásticas por área, nos campos selecionados na derme, antes e após o tratamento com o laser fracionado.

Patriota et al. ⁽³⁸⁾ estudaram o tratamento do fotoenvelhecimento facial com LIP, observando-se aumento da expressão de ICAM-1 na derme após 6 meses do tratamento. Esse aumento foi estatisticamente significativo e foi associado com o aumento dos capilares sanguíneos na derme. Sabe-se que ICAM-1 é uma glicoproteína de membrana envolvida na adesão intercelular e está associada com a adesão de leucócitos ao endotélio vascular ⁽⁴⁷⁾. Esta alteração pode ser relacionada com a inflamação, pois ICAM-1 é produzida quando há invasão

da parede do vaso por leucócitos ou a modificação pode simplesmente ser evidente devido à neoformação vascular que ocorre pela reperfusão dos vasos pré-existentes. Neste estudo, foi observado um aumento da ICAM-1, mas, em contraste com o estudo de Patriota et al. ⁽³⁸⁾, o resultado estatístico foi não significativo.

O ciclo celular pode ser dividido em quatro fases. Cada célula deve replicar o seu material genético durante a fase de síntese de DNA (fase S), antes de iniciar a fase mitótica (fase M). Além disso, intervalos de tempo (*gaps*) são localizados entre a fase de divisão celular (M) e o início da síntese de DNA (S), denominado *gap* 1 (fase G1), bem como o *gap* 2 situado entre o final da fase de síntese de DNA e o início da fase de mitose (fase G2). Existe ainda uma quinta fase denominada fase G0 que corresponde às células viáveis que não entraram no ciclo celular e se tornaram quiescentes. As células na fase G0 entrarão novamente no ciclo celular quando forem reestimuladas. A fase mitótica é diferenciada das demais fases do ciclo, que são em conjunto denominadas interfases ^(48,49).

A análise das fases do ciclo celular exige a identificação de células e ou populações de células que se distribuem morfolologicamente e funcionalmente ao longo do período de seu preparo, síntese e divisão celular. Embora as células em mitose possam ser distinguidas microscopicamente, as células em outras fases do ciclo (G1, S e G2) só podem ser identificadas por critérios bioquímicos e da cinética celular. Neste projeto foi utilizada a metodologia descrita por Vindelov et al. ⁽³⁰⁾ onde as células foram distribuídas nas diferentes fases do ciclo celular pelo teor ou quantidade incorporada de iodeto de propídeo (PI) à célula e sua quantificação por citometria de fluxo.

A citometria de fluxo permite a avaliação da heterogeneidade de culturas celulares, à escala da célula individual, não ignorando outras ferramentas importantes tais como a microscopia de varrimento confocal e a análise de imagens ⁽⁵⁰⁾. Desta forma, dados “discretos” representando subpopulações diferentes podem fornecer uma imagem mais detalhada e real da complexidade e heterogeneidade que ocorre num determinado bioprocessos ^(50,51). Por estes motivos, esta técnica tem tido cada vez mais impacto na comunidade científica.

Foi estudada a análise da distribuição das populações celulares, nas diferentes fases do ciclo celular por citometria de fluxo das amostras pré e após aplicação do laser e evidenciaram alterações significativas. As amostras após laser apresentaram aumento na fase S, diminuição na fase G0/G1 e aumento de DNA fragmentado. Estes resultados demonstram o efeito do laser aumentando significativamente a capacidade de síntese. Não foram encontrados na literatura trabalhos em fibroblastos que avaliassem as diferentes fases do ciclo celular após aplicação de laser fracionado. Faucz ⁽⁵²⁾, estudou luz intensa pulsada em fibroblastos humanos e observou uma maior indução na síntese e reorganização da matriz extracelular.

As mitocôndrias são organelas flexíveis. A maioria das células animais possui um grande número de mitocôndrias porque, através da via da oxidação fosforilativa, elas produzem adenosina trifosfato (ATP), uma forma estável de armazenamento de energia, que pode ser utilizada pela célula para as suas várias atividades, que exigem gasto de energia ⁽⁵³⁾.

Os resultados mostraram que a aplicação do laser aumentou a atividade funcional do potencial elétrico mitocondrial, como também, promoveu o aumento significativo do número total de mitocôndrias.

Na microscopia eletrônica de varredura, normalmente, o objeto a ser observado é preparado de modo a permitir que uma camada fina de um metal pesado, tal como ouro ou paládio, seja depositado na superfície do espécime.

À medida que um feixe de elétrons varre a superfície do objeto, alguns se refletem (elétrons de dispersão) e outros são ejetados (elétrons secundários) a partir da cobertura de metal pesado. Os elétrons de dispersão e os secundários são capturados por detectores de elétrons que são interpretados, coletados e mostrados em um monitor como uma imagem tridimensional ⁽⁵³⁾.

Os resultados, neste estudo, indicam que a aplicação do laser aumentou a atividade funcional do potencial elétrico mitocondrial, ao promover um aumento significativo no número total de mitocôndrias. A MEV foi utilizada para observar a superfície de uma amostra. O estudo dos tecidos com MEV, antes e após a aplicação do laser, revelou mudanças significativas. Antes da aplicação do laser, observou-se na superfície da epiderme que a pele das pacientes estava desidratada e os sulcos proeminentes com matriz extracelular desorganizada. Após a aplicação do laser, a matriz extracelular apresentou-se mais organizada na pele superficial.

Os fibroblastos, células estromais, são células acessórias que influenciam a outros tipos de células adjacentes através da secreção de citocinas e fatores de crescimento e de diferenciação. Fibroblastos desempenham um papel importante na regeneração cutânea e são capazes de migrar em resposta ao TGF- β . O TGF- β é expresso de forma diferente durante a maior parte do processo de regeneração cutânea. A síntese de colágeno ocorre em resposta ao TGF- β , fatores de crescimento semelhantes à insulina e a síntese de ácido hialurônico.

A taxa proliferativa aumentou após o tratamento com o laser Erbium Glass, e está associada ao aumento localizado de forças mecânicas, realizadas por alongamento e

espalhamento dos fibroblastos, medida pela regulação positiva de um tipo de receptor de TGF- β 1 e da liberação de fatores de crescimento do tecido conjuntivo. A remodelação da matriz de colágeno é dependente da via de sinalização do TGF- β ⁽⁵⁴⁾.

Na pele normal, o ácido hialurônico tem uma função crucial no processo de reepitelização, encontrado relativamente elevado na camada basal da epiderme. O qual é responsável pela manutenção do espaço extracelular, proporcionando hidratação e proteção contra a radiação solar ^(55, 56).

Fibrócitos são células progenitoras mesenquimais derivadas de medula óssea que coexpressam marcadores e produtos de fibroblastos, como CD45 + e colágeno tipo I, vimentina + e CD34 + / CD13 +, respectivamente ⁽⁵⁷⁾.

Fibrócitos são fibroblastos inativos com atividade fibrótica ⁽⁵⁸⁾. São importantes no processo de cicatrização, uma vez que contribuem para o mecanismo de formação de granulomas com atividade antigênica e para a produção de colágeno. Além disso, fibrócitos participam na remodelação e na inflamação como uma fonte de citocinas ^(59,60). A produção de fatores de crescimento resulta na formação de novos vasos sanguíneos e desempenham papéis na indução da fibrose ^(60,61).

A detecção de fibrócitos em feridas de pele humana e suas aplicações na determinação da idade do ferimento foi previamente estudada ⁽⁶²⁾. O CD34 é uma proteína de 110-kDa, altamente glicosilada, transmembrânica, presente na camada dérmica, expresso em uma variedade de células mesenquimais, tais como as células endoteliais vasculares, dendrítica dérmica e células perifoliculares. A divergência dos padrões de expressão de CD34 (-) e de IL-1R (+) em fibroblastos após o tratamento com o laser Erbium Glass deve refletir a peculiaridade do microambiente da pele e as circunstâncias fisiológicas desses tipos celulares ⁽⁶³⁾.

O laser Erbium Glass é um tratamento fototérmico e não ablativo que estimula atividades celulares e funções bioquímicas e metabólicas através de um efeito de fototermólise seletiva. Este estudo demonstra que, embora o tratamento de pele rejuvenescida tenha resultado em melhorias clínicas significativas, o tratamento foi capaz de modular a expressão de receptores envolvidos na microinflamação cutânea, induzir neocolagênese e levar à remodelação da matriz extracelular. O laser não ablativo Erbium Glass 1540nm demonstrou ser seguro e eficaz neste processo de remodelamento ^(64,65).

A fototermólise fracionada não ablativo foi recentemente introduzida como um laser inovador que tem sido utilizado com sucesso para o tratamento de rugas, estrias, melasmas e diferentes tipos de cicatrizes. É capaz de estimular a remodelação do colágeno subsequente, enquanto preservando a epiderme, sem causar efeitos colaterais significativos ⁽⁶⁶⁾. Além disso, como o estrato córneo permanece intacto, existe um risco mínimo de infecção, inchaço ou crostas ⁽³⁵⁾.

Os lasers não ablativos minimizam riscos, diferentemente dos lasers ablativos, que podem levar à vaporização completa da epiderme, danos coagulativos variáveis para a derme e tempos de cura prolongados. Lasers não ablativos melhoram esses parâmetros, deixando a epiderme intacta enquanto fornece irradiação à derme com medidas precisas de superfície refrigerada concomitante. Neste estudo, foram utilizados fototermólise seletiva em MTZs de larguras controladas, profundidades e densidades ^(35,67). Os marcadores celulares de reparação cutânea, rejuvenescimento da pele e neocolagênese foram significativamente expressos dentro das áreas de tratamento.

As amostras de pele dos pacientes após tratamento mostraram atividade de fibroblastos com sucesso na remodelação da derme. Eventualmente, a pele foi capaz

de modular a atividade de melanócitos, da resposta inflamatória, o fluxo de sangue e até mesmo a atividade de células-tronco responsáveis pela organização e remodelação do matriz extracelular.

Alterações ultraestruturais foram significativamente mais evidentes nas amostras após a aplicação do laser. Estas modificações incluem a melhora na hidratação, a reorganização das fibras, corneócitos intactos e preenchimento dos sulcos e rugas.

De particular interesse no presente estudo foram as expressões das citocinas pró-inflamatórias, IL-1 e TGF- β , e os marcadores CD34 e da atividade da caspase-3 fosforilada, induzidos pelo tratamento. Tem sido sugerido que estas citocinas primárias são produzidas por células inflamatórias recrutadas para curar as feridas intencionalmente formadas. A fototermólise, supostamente modula a cascata de cicatrização de microferidas ou pequenas lesões do sistema da microcirculação, o que, conseqüentemente, contribui para neocolagênese.

Neste estudo, o aumento na taxa proliferativa e da expressão de TGF- β foi acompanhada pelo aumento no número de células na fase S do ciclo celular. Os nossos resultados sugerem que o laser não ablativo pode ser útil na indução de um processo de cicatrização secundário. Orringer et al. ⁽⁶⁸⁾ demonstraram que a depuração proteolítica da derme fotodanificada, colágeno fragmentado por metaloproteinases de matriz (MMPs), pode facilitar a biossíntese de colágeno.

Mesmo sendo observados resultados significativos, ainda é necessário um maior número de estudos sobre os efeitos bioestimuladores dos lasers fracionados no tratamento do fotoenvelhecimento cutâneo.

Efeitos colaterais, como edema e eritema da pele fotoenvelhecida, observados imediatamente após a aplicação do laser, ocorrem devido à reação inflamatória da pele, provocada pela interação da luz com o tecido, com liberação de calor ⁽⁶⁹⁾. Esses efeitos duraram de 24 a 72 horas e desapareceram completamente. No presente estudo, 33,33% dos indivíduos apresentaram eritema e 26,19% edema na face, que apareceram imediatamente à aplicação do laser e duraram aproximadamente 1 a 3 dias. Em um dos pacientes houve um prurido intenso após algumas horas do procedimento, sendo necessário um tratamento imediato como já foi observado na literatura ⁽⁷⁰⁾.

O tratamento com o laser fracionado foi moderadamente tolerado por 73,34% das pacientes e apenas 13,33% relataram dor intensa. O desconforto caracterizou-se por uma sensação de ardência local durante os disparos que melhorava com aplicação de ar resfriado. Tais efeitos não impediram a continuidade do tratamento. É descrito na literatura que o uso de lidocaína tópica ocluída antes e após a aplicação de ar resfriado, concomitante ao laser, poderia diminuir o desconforto do procedimento ⁽⁷¹⁾. Também não houve queixa sobre a presença de cicatriz na face, decorrente das biópsias que foram feitas com *punch* 4 mm e sutura que geraram cicatrizes muito reduzidas e quase imperceptíveis ao exame clínico.

6 Conclusões

O efeito da terapia com o laser Erbium Glass fracionado não ablativo 1550nm em estimular atividades celulares, funções bioquímicas e metabólicas através de um efeito de fototermólise seletiva foi evidenciado pelos resultados obtidos neste trabalho.

Pontualmente, foi possível concluir:

- ✓ Melhora clínica significativa visível no fotoenvelhecimento;
- ✓ O grau de satisfação foi alto, especialmente em relação à textura, rugas e discromias;
- ✓ Nas intensidades de energia aplicada houve indução na síntese de colágeno demonstrada pela citometria de fluxo, picrosirius e imuno-histoquímica;
- ✓ Estruturalmente, o laser induziu síntese e reorganização da matriz extracelular observada pela microscopia eletrônica de varredura;
- ✓ Aumento na expressão de marcadores relacionados ao potencial pró-inflamatório responsável pelo remodelamento da MEC, como IL-1, TGF- β e ICAM-1.

7 Anexos

Anexo 1 – Reatividade da pele humana à radiação solar baseada nos fototipos de I a VI

CLASSIFICAÇÃO DE FITZPATRICK			
Tipo de pele	Cor	Sensibilidade à RUV	Reação
I	Branca clara	Muito sensível	Sempre queima nunca pigmenta
II	Branca	Muito sensível	Pigmenta pouco
III	Morena clara	Sensível	Queima, pigmenta moderadamente
IV	Morena escura	Pouco sensível	Queima pouco, sempre pigmenta
V	Parda	Pouquíssimo sensível	Nunca queima, sempre pigmenta
VI	Negra	Insensível	Nunca queima, sempre pigmenta

Fitzpatrick TB, 1999. p. 1606.

Anexo 2. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

MODELO DE TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA **ESTUDO DO LASER FRACIONADO NO TRATAMENTO DO FOTOENVELHECIMENTO CUTÂNEO: AVALIAÇÃO CLÍNICA, HISTOPATOLÓGICA, MICROSCOPIA ELETRÔNICA E IMUNO-HISTOQUÍMICA**

2. PESQUISADOR : LUIZ CARLOS CUCÉ CARGO/FUNÇÃO: PROFESSOR

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 9575

UNIDADE DO HCFMUSP: DERMATOLOGIA /ICHC

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO x RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐

4.DURAÇÃO DA PESQUISA : 2 anos

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

1 – Essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, que visa avaliar a melhora dos sinais de envelhecimento da face provocado pelo sol (manchas, linhas e rugas finas), através da aplicação de laser 1 vez ao mês durante 3 meses.

2 – Para esta pesquisa, você será submetida inicialmente a uma sessão de fotos da face (frente e lateral D e E).

3 – Em seguida, você será submetida a uma biópsia. Neste procedimento, o médico irá anestesiá-la uma pequena região da face, à direita (em frente a orelha D) através de uma injeção com agulha extremamente fina e anestésico lidocaína 2% sem vasoconstritor. A seguir, o médico usará um instrumento que realiza um pequeno corte circular e retirará um pequeno fragmento de pele na região anestesiada. O médico então dará 3 pontos com fio fino e delicado para fechar o corte, fará um curativo no local e orientará seu retorno no ambulatório para a retirada dos pontos em 7 dias.

A seguir, será orientada a usar um filtro solar específico com fator de proteção solar 50 todas as manhãs, na face. Será submetida a 3 aplicações de laser, com intervalos de 30 dias entre eles.

Para a aplicação do laser, o médico deverá limpar sua face com gaze umedecida com solução de limpeza específica e em seguida aplicará o laser, tomando cuidado para não aplicá-lo na região dos olhos. O paciente deverá usar óculos específico durante toda a aplicação do laser. O tempo de aplicação do laser na sua face será de 20 minutos desde o início da aplicação e o médico avaliará os efeitos do procedimento durante todo este tempo. Após este período, o médico aplicará uma solução hidratante em toda a sua face, com gaze umedecida, para finalizar o procedimento.

Trinta dias após a aplicação do último laser, você deverá comparecer ao ambulatório para fazer uma nova sessão de fotos, nas mesmas áreas fotografadas no início do tratamento. Após, o médico realizará uma biópsia na região em frente a orelha (pré auricular), porém do outro lado da face (lado esquerdo), da mesma maneira que foi realizada no início do tratamento do lado direito. Neste procedimento, o médico irá anestesiá-la a região através de uma injeção com agulha extremamente fina e anestésico lidocaína 2% sem vasoconstritor. A seguir, o médico usará um instrumento que realiza um pequeno corte circular e retirará um pequeno fragmento de pele na região anestesiada. O médico então dará 3 pontos com fio fino e delicado para fechar o corte, fará um curativo no local e orientará seu retorno no ambulatório para a retirada dos pontos em 7 dias.

4 – Durante a aplicação do laser, você poderá sentir um ardor leve a intenso e a sua pele poderá ficar vermelha. Após a aplicação de gelo este ardor melhorará e esta vermelhidão desaparecerá em 4 dias.

5 – Após o término deste estudo, poderemos avaliar a melhoria da pele com manchas e rugas finas, proporcionada pelo laser.

6 – Existem outros lasers utilizados no tratamento de manchas e rugas finas, porém estes não estão disponíveis no HC.

7 – Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dra Régia Celli Ribeiro Patriota que pode ser encontrada no endereço Rua Veiga Filho, 350 sala 403 Higienópolis São Paulo, telefone: 36622103. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappelq@hcnet.usp.br

8 – É garantida a liberdade da retirada de seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

9 – Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente;

10 – Você será mantida atualizada sobre os resultados parciais e finais desta pesquisa.

11 – Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

12 – Os dados e o material coletados serão utilizados somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo. **“ESTUDO DO LASER FRACIONADO NO TRATAMENTO DO FOTOENVELHECIMENTO CUTÂNEO: AVALIAÇÃO CLÍNICA, HISTOPATOLÓGICA, MICROSCOPIA ELETRÔNICA E IMUNO-HISTOQUÍMICA.”**

Eu discuti com a Dra. Régia Celli Ribeiro Patriota sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal

Data ____/____/____

Assinatura da Testemunha

Data ____/____/____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo

Data ____/____/____

Anexo 3. Aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 25/05/2011, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0300/11**, intitulado: "**ESTUDO COMPARATIVO ANTES E APÓS LUZ INTENSA PULSADA E LASER FRACIONADO NO TRATAMENTO DO FOTOENVELHECIMENTO CUTÂNEO: AVALIAÇÃO CLÍNICA, HISTOPATOLÓGICA E IMUNOISTOQUÍMICA.**" apresentado pelo Departamento de **DERMATOLOGIA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Luiz Carlos Cucé**

Pesquisador (a) Executante: **Régia Celli Ribeiro Patriota**

CAPPesq, 25 de Maio de 2011

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Anexo 4. Entrevista

Nome:

Endereço: Rua/Av

Bairro:

Telefones para contato

Naturalidade:

Procedência:

Profissão:

Sexo: ()M ()F

Data de nascimento:

Fototipo: ()I ()II ()III ()IV ()V

Tempo de evolução:

Classificação de Glogau: ()1 ()2 ()3 ()4

Componentes: ()Pigmentação acastanhada ()Poros abertos

()Flacidez

Exposição solar (quanto e há quanto tempo):

Uso de filtro solar:

Uso de cosméticos:

Tratamentos anteriores:

Outras doenças de pele/geral:

Uso de medicações:

Menopausa:

História de quelóide:

Alergia:

Anexo 5. Avaliação Fotográfica segundo os três observadores

Para manter a padronização das fotografias as pacientes foram fotografadas sempre pela mesma pessoa e no mesmo local, sob as mesmas condições de luz.

As fotografias eram identificadas com pré e 4 meses após término do tratamento.

Favor analisar se houve alterações no aspecto da pele, do clareamento, das rugas e da flacidez após o tratamento com laser fracionado.

As fotos foram avaliadas no monitor do computador.

Ao término da análise de cada paciente assinale com um X em:

- Melhora Discreta: se houve pequena melhora do aspecto da pele: textura, clareamento, rugas e flacidez.

- Melhora Moderada: se houve uma melhora razoável do aspecto da pele: textura, clareamento, rugas e flacidez.

- Melhora intensa: se houve uma grande melhora do aspecto da pele: textura, clareamento, rugas e flacidez.

CASO 1 a 15 () Melhora Discreta

() Melhora Moderada

() Melhora Intensa

8 Referências

1. Roenigk HH Junior. Treatment of the aging face. *Dermatol Clin*. 1995;13:245-61.
2. Sampaio SAP, Rivitti EA. *Dermatologia*. São Paulo: Artes Médicas; 1998. p.634-5.
3. Chung JH, Hanft VN, Kang S. Aging and photoaging. *J Am Acad Dermatol*. 2003;49:690-7.
4. Gilchrest BA. Skin aging and photoaging: an overview. *J Am Acad Dermatol*. 1989;21:610-3.
5. Elson ML. Treatment of photoaging: a personal comment and open study of the use of glycolic acid. *J Dermatol*. 1993;4:215-8.
6. Fusco FJ. The aging face and skin: common signs and treatment. *Clin Plast Surg*. 2001;28:1-12.
7. Kadunc BV. *Ácido pirúvico: técnica da padronização para uso em esfoliações químicas através do estudo experimental [tese]*. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 1998.
8. Garmyn M, Yaar M, Boileau N, Backendorf C, Gilchrest BA. Effect of aging and habitual sun exposure on the genetic response of cultured human Keratinocytes to solar: simulated irradiation. *J Invest Dermatol*. 1992;99:743-8.
9. Odom RB. Topical tretinoin for the treatment of photo damaged skin. In: Weelmd RG, editor. *Cutaneous surgery*. Philadelphia: Saunders; 1994. p.28-9.

-
10. Roitt L, Male D, Brostoff J. *Immunology*. 5th ed. Londres: Mosby; 1998.
 11. Dougherty GJ, Murdoch S, Hogg N. The function of human intercellular adhesion molecule-1(ICAM-1) in the generation of an immune response. *Eur J Immunol*. 1988;19:35-9.
 12. Albelda SM. Endothelial and epithelial cell adhesion molecules. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1991;4:195–203.
 13. Nagaoka T, Kaburagi Y, Hamaguchi Y, Hasegawa M, Takehara K, Steeber DA, Tedder TF, Sato S. Delayed woundhealing in the absence of intercellular adhesion molecule-1 or Lselectinexpression. *Am J Pathol*. 2000;157:237-47.
 14. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cytokines. in: Cellular and molecular immunology. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 1997. p. 285-6.
 15. Subauste MC, Choi DC, Proud D. Transient exposure of humanbronchial epithelial cells to cytokines leads to persistent increasedexpression of ICAM-1. *Inflammation*. 2001;25:373-80.
 16. Springer TA. Adhesion receptors in the immune system. *Nature*. 1990;346:425-34.
 17. Lisby S, Ralfkiaer E, Rothlein R, Vejlgard GL. Intercellular adhesion molecule - 1 (ICAM-I) expression correlated to inflammation. *Br J Dermatol*. 1989;120:479-84.
 18. Singer KIH, Tuck DT, Sampson HA. Epidermal keratinocytes express the intercellular adhesion molecule in inflammatory dermatoses. *J Invest Dermatol*. 1989;92:746-50.
 19. De Panfihis G, Manara GC, Ferrari C. Adhesion molecules ou the plasma membrane of epidermal cells.II. *J Invest Dermatol*. 1990;94:317-21.

-
20. Takeuchi F, Streilein R, Robert D, Hall R. Increased E-Selectin, IL-8 and IL-10 gene expression in human skin after minimal trauma. *Exp Dermatol*. 2003;12:777-83.
 21. Iyer S, Friedli A, Bowes L, Kricorian G, Fitzpatrick RE. Full face laser resurfacing: therapy and prophylaxis for actinic keratosis and non-melanoma skin cancer. *Lasers Surg Med*. 2004;34:114-9.
 22. Lent WM, David LM. Laser resurfacing: a safe and predictable method of skin resurfacing. *J Cutan Laser Ther*. 1999;1:87-94.
 23. Hedelund L, Bjerring P, Egekvist H, Haedersdal M. Ablative versus non-ablative treatment of perioral rhytides. A randomized controlled trial with long-term blinded clinical evaluations and non-invasive measurements. *Lasers Surg Med*. 2006;38:129-36.
 24. Huzaira M, Anderson RR, Sink K, Manstein D. Intradermal focusing of near-infrared optical pulses: a new approach for non-ablative laser therapy. *Lasers Surg Med*. 2003;15(Suppl):66.
 25. Manstein D, Herron GS, Sink RK, Tanner H, Anderson RR. Fractional photothermolysis: a new concept for cutaneous remodeling using microscopic patterns of thermal injury. *Lasers Surg Med*. 2004;34:426-38.
 26. Fitzpatrick TB. Fitzpatrick's reactivity of human skin to solar radiation based on skin phototypes I to V: table 138-5. In: Freedberg IM, Eisen AZ, Wolff K, Austen KF, Golsmith LA, Katz SI, Fitzpatrick TB. *Dermatology in general medicine*. 15thed. New York: McGraw-Hill; 1999. p.1606.
 27. Glogau RG. Chemical peeling and aging skin. *J Geriatr Dermatol*. 1994;2:30-5.
 28. Fullmer HM, Sheetz JH, Narkates AJ. Oxytalan connective tissue fibers: a review. *J Oral Pathol*. 1974;3:291-316.

-
29. Hsu SM, Raine L. The use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in diagnostic and research pathology. In: Ronald A, Delellis MB, editors. *Advances in immunohistochemistry*. Paris: Masson Publishing; 1983.
 30. Vindelov LL, Christensen IJ, Nissen NI. Standardization of high-resolution flowcytometric DNA analysis by the simultaneous use of chicken and troutred blood cells as internal reference standards. *Cytometry*. 1983;3:328-31.
 31. Johnson LV, Walsh ML, Bockus BJ, Chen LB. Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123. *Proc Nat Acad Sci USA*. 1980;77:990-4.
 32. Johnson LV, Walsh ML, Bockus BJ, Chen LB. Monitoring of relative mitochondrial membrane potential in living cells by fluorescence microscopy. *J Cell Biol*. 1981;88:526-35.
 33. Irion G. Cicatrização normal. In: Irion G. *Feridas: novas abordagens, manejo clínico e atlas em cores*. Rio de Janeiro: LAB; 2005, 18-25.
 34. Jih MH, Kimyai-Asadi A. Fractional photo thermolysis: a review and update. *Semin Cutan Med Surg*. 2008;27:63-71.
 35. Laubach HJ, Tannous Z, Anderson RR, Manstein D. Skin responses to fractional photo thermolysis. *Lasers Surg Med*. 2006;38:142-9.
 36. Vasily DB, Cerino ME, Ziselman EM, Zeina ST. Non-ablative fractional resurfacing of surgical and post-traumatic scars. *J Drugs Dermatol*. 2009;8:998-1005.
 37. Mordon S, Capon A, Creusy C, Fleurisse L, Buys B, Faucheux M, Servell P. In vivo experimental evaluation of skin remodeling by using an Er: Glass laser with contact cooling. *Lasers Surg.Med*. 2000;27:1-9.

-
38. Patriota RC, Rodrigues CJ, Cucé LC. Intense pulsed light in photoaging: a clinical, histopathological and immunohistochemical evaluation. *An Bras Dermatol*. 2011; 86:1129-33.
 39. Trelles MA, Allones I, Levy JL, Calderhead RG, Moreno-Arias GA. Combined nonablative skin rejuvenation with the 595 - and 1450-nm. *Lasers Dermatol Surg*. 2004;30:1292-8.
 40. Ross EV, Sajben FP, Hsia J, Barnette D, Miller CH, McKinlay JR. Non ablative skin remodeling: selective dermal heating with a mid-infrared laser and contact cooling combination. *Laser Surg Med*. 2000;26:186-95.
 41. Nelson JS, Majaron B, Kelly KM. What is non ablative photo rejuvenation of human skin? *Semin Cutan Med Surg*. 2002;21:238-50.
 42. Ruiz-Esparsa J, Gomez JB. The medical face lift: a noninvasive, nonsurgical approach to tissue tightening in facial skin using non ablative radiofrequency. *Dermatol Surg*. 2003;29:325-32.
 43. Ruiz-Esparza J. Near painless, nonablative, immediate skin contraction induced by low-fluence irradiation with new infrared device: a report of 25 patients. *Dermatol Surg*. 2006;32:601-10. Erratum: *Dermatol Surg*. 2006;32:proceeding 773.
 44. Fournier N, Dahan S, Barneon G, Diridollou S, Lagarde JM, Gall Y, Mordon S. Non ablative remodeling: clinical, histologic, ultrasound imaging, and profilometric evaluation of a 1540 nm Er:Glass laser. *Dermatol Surg*. 2001;27:799-806.
 45. Smith BD. Expression and regulation of the collagen family in skin. In: Falanga V. *Cutaneous wound healing*. London: Martin Dunitz, 2001. p.57-80.

-
46. Fournier N, Dahan S, Barneon G, Diridollou S, Lagarde JM, Gall Y, Mordon S. Non ablative remodeling: clinical, histologic, ultrasound imaging, and profilometric evaluation of a 1540 nm Er:Glass laser. *Dermatol Surg.* 2001;27:799-806.
 47. Cid CM, Cebrián M, Font C, Vinet CB, Rodríguez JH, Esparza J, Márquez AU, Grau JM. Cell adhesion molecules in the development of inflammatory infiltrates in giant cell arteritis. *Arthritis Rheum.* 2000;43:184-94.
 48. Jayat C, Ratinaud MH. Cell cycle analysis by flow cytometry: principles and applications. *Biol Cell.* 1993;78:15-25.
 49. Gillett GE, Barnes DM. Cellcycle. *Mol Pathol.* 1998;51:310-6.
 50. Porter J, Deere D, Pickup R, Edwards C. Fluorescent probes and flow cytometry: new insights into environmental bacteriology. *Cytometry.* 1996;23:91-6.
 51. Rieseberg M, Kasper C, Reardon KF, Scheper T. Flow cytometry in biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2001;56:350-60.
 52. Faucz LRL. Avaliação dos efeitos proliferativos e de síntese induzidos pela luz intensa pulsada em fibroblastos e células endoteliais humana [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011.
 53. Gartner LP, Hiatt JL. *Tratado de Histologia em cores.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1997. p.6-55.
 54. Kishi K, Okabe K, Shimizu R, Kubota Y. Fetal skin possesses the ability to regenerate completely: complete regeneration of Skin. *Keio J Med.* 2012; 61:101.

-
55. Karvinen S, Pasonen-Seppänen S, Hyttinen JM, Pienimäki JP, Törrönen K, Jokela TA, Tammi MI, Tammi R. Keratinocyte growth factor stimulates migration and hyaluronan synthesis in the epidermis by activation of keratinocyte hyaluronan synthases 2 and 3. *J Biol Chem*. 2003;278:49495-504.
 56. Pasonen-Seppanen S, Karvinen S, Törrönen K, Hyttinen JM, Jokela T, Lammi MJ, Tammi MI, Tammi R. EGF up regulates, whereas TGF-beta down regulates, the hyaluronan synthases Has2 and Has3 in organo typic keratinocyte cultures: correlations with epidermal proliferation and differentiation. *J Invest Dermatol*. 2003;120:1038-44.
 57. Chesney J, Metz C, Stavitsky AB, Bacher M, Bucala R. Regulated production of type I collagen and inflammatory cytokines by peripheral blood fibrocytes. *J Immunol*. 1998;160:419-25.
 58. Banks WJ. *Histologia veterinária aplicada*. 2^a ed. São Paulo: Manole; 1992. p.629.
 59. Abe R, Donnelly SC, Peng T, Bucala R, Metz CN. Peripheral blood fibrocytes: differentiation pathway and migration to wound sites. *J Immunol*. 2001;166:12:7556-62.
 60. Quan TE, Cowper S, Wu SP, Bockenstedt LK, Bucala R. Circulating fibrocytes: collagen-secreting cells of the peripheral blood. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004;36:598-606.
 61. Metz CN. Fibrocytes: a unique cell population implicated in wound healing. *Cell Mol Life Sci*. 2002; 60:7:1342-50.
 62. Ishida Y, Kimura A, Takayasu T, Eisenmenger W, Kondo T. Detection of fibrocytes in human skin wounds and its application for wound age determination. *Int J Legal Med*. 2009;123:299-304.

-
63. Krause DS, Fackler MJ, Civin CI, May WS. CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood*. 1996;87:1-13.
 64. Dahan S, Lagarde JM, Turlier V, Courrech L, Mordon S. Treatment of neck lines and forehead rhytids with a nonablative 1540-nm Er:glass laser: a controlled clinical study combined with the measurement of the thickness and the mechanical properties of the skin. *Dermatol. Surg*. 2004;30:872-9; discussion 879-80.
 65. Mordon S, Capon A, Creusy C, Fleurisse L, Buys B, Faucheux M, Servell P. In vivo experimental evaluation of skin remodeling by using an Erbium Glass laser with contact cooling. *Lasers Surg Med*. 2000;27:1-9.
 66. Narurkar VA. Non ablative fractional laser resurfacing. *Dermatol Clin*. 2009;27:473-8.
 67. Khan MH, Sink RK, Manstein D, Eimerl D, Anderson RR. Intra dermally focused infrared laser pulses: Thermal effects at defined tissue depths. *Lasers Surg Med*. 2005;36:270-80.
 68. Orringer JS, Voorhees JJ, Hamilton T, Hammerberg C, Kang S, Johnson TM, Karimipour DJ, Fisher G. Dermal matrix remodeling after non ablative laser therapy. *J Am Acad Dermatol*. 2005;53:775-82.
 69. Spicer MS, Goldberg DJ. Lasers in dermatology. *J Am Acad Dermatol*. 1996;34:1-25.
 70. Fisher GH, Geronemus RG. Short-term side effects of fractional photothermolysis. *Dermatol Surg*. 2005;31:1245-9.
 71. Fisher GH, Kim KH, Bernstein LJ, Geronemus RG. Concurrent use of handheld forced cold air device minimizes patient discomfort during fractional photothermolysis. *Dermatol Surg*. 2005;31:1242-3, discussion 1244.